



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

EL COLOR DE LA CARNE BOVINA

***Estudio de la influencia y asociación de
polimorfismos en genes candidatos***

Tesista: FALOMIR LOCKHART, Agustín Horacio

Director: GIOVAMBATTISTA, Guillermo

Codirector: ROGBERG MUÑOZ, Andrés

Año: 2020

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP – CCT-La Plata, CONICET), bajo la dirección del Dr. Guillermo Giovambattista y la codirección del Dr. Andrés Rogberg Muñoz.

*A mis padres, Mónica y Horacio,
por ayudarme a llegar hasta acá*

*A Maca, mi amor
por acompañarme en todo este camino
dándome siempre su apoyo*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera, con su esfuerzo, apoyo y conocimientos me ayudaron a completar esta Tesis Doctoral.

En primer lugar agradecer a mis Directores Guille y Andrés, por el compromiso que asumieron y todo el esfuerzo que han hecho para guiarme durante todo este tiempo, por el respeto y la predisposición para transmitirme sus conocimientos y ayudarme en cada etapa. También por ayudarme en la escritura y corrección, que tanto trabajo y tiempo llevó.

A todos los integrantes del IGEVET, investigadores, profesionales, secretarias y becarios, que me acompañaron todos estos años. Gracias a la Dra. Pilar Peral García, que como Directora me permitió ingresar a trabajar al Instituto.

A Egle, Diego, Juli, Clau y Lau, grandes amigos que me dio el IGEVET, quienes hicieron el día a día mucho más ameno y divertido, acompañándome en los momentos buenos y malos, con su consejos y transmitiéndome su experiencia y conocimientos de manera desinteresada cada vez que los necesité.

A todos los amigos que me dejó Exactas, con quienes pasé grandes momentos y que a pesar de los años siguen estando presentes. Nombrarlos a todos sería interminable, pero no quiero dejar de destacar el rol que tuvieron y aun tienen Mati, Dante, Marcos y Juan.

A mis amigos del Nacional Gonza, Juanma, Jules, Charly y Vicky, a quienes el tiempo y la distancia no logran alejar.

A mis amigos de Triskel, los más recientes pero con quienes parece que nos conociéramos de siempre, Mauri, Fer, Sabri, Lean y Martin.

A todos mis compañeros docentes, que me han ayudado a mejorar no solo como docente sino también como persona. Especialmente a Vir, Dami, Fran y Seba, grandes amigos que me enseñaron en mis comienzos la importancia del trabajo en equipo y la solidaridad en la docencia.

Quiero reconocer el aporte del CONICET, por la beca y los recursos que me permitieron desarrollar este trabajo. A la Facultad de Cs Exactas, que me permitió completar esta Tesis, y a todos los docentes que me formaron transmitiéndome sus conocimientos.

Gracias a Enrique Martins del IDIP por ayudarnos en las determinaciones del hierro, y al Dr. Gastón Ferrara del IFLySiB por su aporte para el estudio de dinámicas moleculares. Gracias a la Dra. Cristina Añón del CIDCA, siempre dispuesta a resolver nuestras dudas y aconsejarnos, y a la Cátedra de Bromatología de Exactas por permitirnos utilizar su laboratorio.

A los Jurados, por el tiempo y esfuerzo invertidos en leer y evaluar esta Tesis.

A Maca, mi amor, mi compañera de vida durante todos estos años, por tantos momentos felices junto a Erwin, Penny y Floki, por enseñarme a amarlos y quererlos. Eternamente agradecido por todo el amor que me das, por ser feliz por mis logros y alentarme a seguir adelante. Gracias por la segunda familia que me diste, y gracias a Anita y mis cuñados, por aceptarme como parte de su familia, preocupándose e interesándose por mí.

Finalmente a toda mi familia, siempre incondicional en su apoyo, muchas gracias a mis primos, tías y abuelos por tantos momentos felices. Infinitas gracias a mi mamá, mi papá y mis hermanos, por todo el esfuerzo y el apoyo que me han dado para llegar hasta acá, y el afecto que me dan todos los días. Los llevo siempre conmigo.

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes trabajos:

Falomir-Lockhart AH, Rogberg-Muñoz A, Papaleo-Mazzucco J, Goszczynski DE, Lirón JP, Fernandez ME, Añon MC, Melucci LM, Giovambattista G. 2015. Study of the influence of genes related to muscle oxidative processes on beef color. *Meat Science* 108: 17-20. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.05.005

Falomir-Lockhart AH, Villegas-Castagnaso EE, Giovambattista G, Rogberg-Muñoz A. 2018. Computational prediction of nsSNPs effects on protein function and structure, a prioritization approach for further in vitro studies applied to bovine GSTP1. *Free Radical Biology and Medicine* 129: 486-491. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.403

INDICE

INDICE	I
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS y SIGLAS	IX
RESUMEN	XI
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Color y la Calidad de la Carne	3
1.2 Bases Bioquímicas del Color de la Carne	4
<i>1.2.1 Los pigmentos del músculo</i>	5
<i>1.2.2 Estado redox celular</i>	8
<i>1.2.3 Descenso del pH post mortem</i>	12
1.3 Los Sistemas de Producción y el Color	13
1.4 Genética y Marcadores Moleculares	16
1.5 Estudios <i>in silico</i>	18
1.6 Interacción Entre Caracteres Fenotípicos: Modelos de Ecuaciones Estructurales	21
1.7 Objetivos	23
<i>1.7.1 Objetivos generales</i>	23
<i>1.7.2 Objetivos específicos</i>	23
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Recursos Animales y Muestreo	27
2.2 Muestras de Carne y Determinaciones Fenotípicas	29
<i>2.2.1 Determinaciones fenotípicas del grupo G-I</i>	29
<i>2.2.1.1 Muestreo</i>	30
<i>2.2.1.2 Mediciones asociadas al color de la carne</i>	30

2.2.1.3 Mediciones asociadas al contenido graso de la carne	31
2.2.2 Determinaciones fenotípicas del grupo G-II	32
2.2.2.1 Mediciones ecográficas de calidad de carcasa	32
2.2.2.2 Muestreo	32
2.2.2.3 Mediciones asociadas al color de la carne	33
2.2.2.4 Mediciones asociadas al contenido graso de la carne	33
2.2.2.5 Mediciones asociadas a los micronutrientes de la carne	35
2.2.2.6 Mediciones asociadas al poder oxidativo total de la carne	35
2.3 Extracción y Cuantificación de ADN	37
2.3.1 Extracción de ADN de muestras de pelo	37
2.3.2 Extracción de ADN de muestras de sangre con el kit Wizard ®	37
2.3.3 Extracción de ADN de muestras de sangre por el método orgánico	37
2.3.4 Extracción de ADN de muestras de carne	38
2.3.5 Cuantificación de ADN	39
2.4 Selección de Genes Candidatos, Secuenciación y Genotipificación	39
2.4.1 Selección de genes candidatos	39
2.4.2 Genotipificación para estudio de asociación	41
2.4.3 Re-secuenciación de genes candidatos	42
2.4.4 Análisis de secuencias	43
2.5 Análisis estadísticos	46
2.5.1 Análisis de variabilidad genética	46
2.5.2 Estudio de asociación	46
2.5.3 Modelos de ecuaciones estructurales	47
2.6 Estudios <i>in silico</i>	49
2.6.1 Análisis funcional de sustituciones aminoacídicas en GSTP1	49
2.6.2 Modelado estructural de GSTP1 y visualización	51
2.6.3 Estudios basados en Dinámica Molecular	52

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1 Estudio Exploratorio de Asociación	59
3.1.1 <i>Datos fenotípicos del Grupo G-I</i>	59
3.1.2 <i>Datos genotípicos del Grupo G-I</i>	60
3.1.3 <i>Estudio de asociación</i>	62
3.2 Glutatión S-Transferasa P1	65
3.2.1 <i>Re-secuenciación y reconstrucción de haplotipos</i>	66
3.2.2 <i>Estudio in silico de las sustituciones no sinónimas</i>	70
3.2.3 <i>Evaluación del efecto de las sustituciones no sinónimas en la estructura y función de GSTP1</i>	74
3.2.4 <i>Modelado por homología y análisis de la estructura proteica</i>	76
3.2.5 <i>Estudios basados en dinámica molecular</i>	81
3.3 Lactato Deshidrogenasa A	92
3.3.1 <i>Re-secuenciación</i>	92
3.4 Estudio por Modelos de Ecuaciones Estructurales	93
3.4.1 <i>Datos fenotípicos del Grupo G-II</i>	93
3.4.2 <i>Interacciones entre variables</i>	95
Capítulo 4. CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	117
Trabajos publicados a partir de esta Tesis	125

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poblaciones animales experimentales utilizadas.	29
Tabla 2. SNPs genotipificados para el estudio de asociación exploratorio.	42
Tabla 3. <i>Primers</i> diseñados para amplificar los genes GSTP1 y LDHA.	44
Tabla 4. Media y desviación estándar de las variables fenotípicas analizadas del grupo G-I en el estudio de asociación.	59
Tabla 5. Frecuencias alélicas, heterocigocidad esperada (he) y Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).	61
Tabla 6. Media y desviación estándar de los parámetros colorimétricos CIELAB asociados para cada genotipo de los SNPs estudiados.	63
Tabla 7. Haplotipos reconstruidos (p-ARNm), p-Prot y sustituciones aminoacídicas en las distintas razas del grupo G-I.	70
Tabla 8. Resultados del análisis individual de las sustituciones aminoacídicas con las herramientas <i>in silico</i> SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, PANTHER, MutPred 2 y I-Mutant 3.	72
Tabla 9. Área superficial y volumen de la proteína y del sitio activo, para las distintas p-Prot, y RMSD respecto a la estructura del consenso.	77
Tabla 10. Media y desviación estándar de las variables fenotípicas del grupo G-II estudiadas mediante SEM.	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equilibrios <i>post mortem</i> de las diferentes isoformas de la mioglobina.	7
Figura 2. Esquema del análisis de ligamiento de los marcadores localizados en el Cromosoma 29, los bloques formados y los haplotipos reconstruidos.	62
Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína GSTP1 de diferentes especies.	67
Figura 4. Región amplificada y posiciones polimórficas encontradas por re-secuenciación ubicadas en zonas codificantes.	68
Figura 5. Estructura de la enzima GSTP1.	75
Figura 6. Estructura modelada de p-Prot VI.	78
Figura 7. Estructura modelada de p-Prot III.	80
Figura 8. Estructura modelada de p-Prot VII.	80
Figura 9. Evolución de la desviación cuadrática media (RMSD) de las proteínas.	82
Figura 10. Evolución de la superficie accesible al solvente de las proteínas.	84
Figura 11. Evolución del radio de giro de las proteínas.	84
Figura 12. Fluctuaciones del RMSD (RMSF) de los C <i>alpha</i> .	86
Figura 13. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y II.	86
Figura 14. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y III.	88
Figura 15. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y IV.	88
Figura 16. Acercamiento al nuevo residuo y los aminoácidos cercanos, en p-Prot IV.	89
Figura 17. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y V.	89
Figura 18. Estructura p-Prot V con el nuevo residuo de triptofano.	90
Figura 19. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y VI.	90
Figura 20. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y VII.	91
Figura 21. Esquemas representando la relación significativa entre variables fenotípicas obtenidas a partir de estudios de SEM.	96
Figura 22. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína LDHA de diferentes especies.	124

ABREVIATURAS y SIGLAS

An	Angus
AGMI	Ácidos grasos mono-insaturados
AGPI	Ácidos grasos poli-insaturados
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AOB	Área ojo de bife
Br	Brahman
CCS	Chaperona del Cobre para la Superóxido Dismutasa
COMb	Carboximioglobina
Cr	Criollo
DeoMb	Deoximioglobina
DM	Dinámica molecular
EET	Extracto etéreo total
EGD	Espesor de grasa dorsal
FAMEs	Metil ésteres de ácidos grasos
GPX4	Glutación Peroxidasa 4
GSH	Glutación
GSSG	Disulfuro de glutación
GSTP1	Glutación S-Transferasa P1
He	Hereford
Ho	Holando
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
LDHA	Cadena A de la Lactato Deshidrogenasa
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LD	músculo <i>Longissimus dorsi</i>
Li	Limousin
MAS	Selección asistida por marcadores
Mb	Mioglobina
MDA	Malondialdehído
MetMb	Metamioglobina
MMR	Metamioglobina reductasa
Mu	Murray
Ne	Nelore
NPSH	Sulfhidrilos no proteicos
nsSNP	Polimorfismo de nucleótido simple no sinónimo
OxyMb	Oximioglobina
PA	Porcentaje de agua
PC	Porcentaje de cenizas
Pf	Peso final del animal
PGI	Porcentaje de grasa intramuscular
pO ₂	Presión parcial de Oxígeno
PR	Poder reductor de la muestra de carne
p-ARNm	Secuencia predicha de ARN mensajero
p-Prot	Secuencia predicha de proteína
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
RMSD	Desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación del RMSD
SEM	Modelos de Ecuaciones Estructurales
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple

ABREVIATURAS Y SIGLAS

SOD	Superóxido Dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Wa	Wagyu
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
$\Delta\Delta G$	Cambio en la energía libre de Gibbs de desnaturalización

RESUMEN

La definición de la calidad de la carne depende en gran medida de percepciones subjetivas del consumidor, siendo el color el primer atributo que detecta. Por el proceso de decoloración un 15% de la carne vacuna pierde valor, por lo cual este atributo tiene un gran impacto económico. A nivel molecular la carne debe su color principalmente a la mioglobina, al ligando que tenga unido y al equilibrio entre los diferentes estados redox del átomo de hierro contenido en la proteína. Esto se ve afectado por factores genéticos, ambientales, de transporte y de procesamiento. Sin embargo, en bovinos los efectos genéticos han sido poco estudiados. Hoy en día se conocen los procesos bioquímicos que experimenta *post mortem* el músculo y lo convierten en carne, siendo los más importantes en la decoloración la concentración de O₂ residual y su consumo, el descenso del pH, la generación de radicales libres y agentes oxidantes, y el estado redox celular. En este contexto, se seleccionaron genes candidatos que codifican para el principal pigmento (MB), que protegen contra el estrés oxidativo degradando agentes oxidantes (GSTP1, GPX4, CCS), y regulan la concentración de NADH, reductor importante en los equilibrios redox de la mioglobina (LDHA), con el objetivo de estudiar su influencia en la determinación del color de la carne. Primero se realizó un análisis de asociación exploratorio entre marcadores genéticos de los genes candidatos y caracteres fenotípicos, encontrando una asociación entre polimorfismos de los genes GSTP1 y LDHA, y parámetros colorimétricos. Luego se procedió al análisis de estos genes por re-secuenciación en individuos de diferentes razas para determinar su variabilidad genética. En el caso de GSTP1 se encontraron múltiples posiciones polimórficas en regiones codificantes del gen que causan sustituciones aminoacídicas en su proteína. A continuación se realizó un análisis *in silico* con diversas herramientas bioinformáticas, para priorizar dichas sustituciones en función a su potencial impacto sobre la estructura y función de la enzima, seguido de estudios de dinámica molecular para evidenciar a nivel atómico dichos efectos. Con respecto a LDHA, los resultados fueron diferentes y no se detectaron polimorfismos en regiones codificantes, sin embargo se observaron diferencias en el análisis

de actividad de LDH (*in vitro*) en carnes provenientes de diferentes animales. A partir de estos datos se realizó un análisis de sistemas de ecuaciones estructurales incluyendo variables fenotípicas de una población de individuos de tres razas, que permitió obtener una red de efectos causales entre las variables, que aporta información sobre la determinación a nivel biológico de un carácter tan complejo como el color de la carne.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El Color y la Calidad de la Carne

El concepto de calidad es algo complejo, que depende de la propiedad que se esté considerando. La calidad de un producto alimenticio puede definirse como todas aquellas características que le otorgan un mayor grado de aceptación y valor frente a quien lo consume; y refiere a todos los atributos por los que los consumidores están dispuestos a pagar un mayor precio (Guerrero y col., 2018).

La calidad de la carne es un carácter difícil de definir en términos objetivos, ya que depende en gran medida de percepciones subjetivas del consumidor. Aun así, podría definirse como la aceptabilidad que el producto tendría en un mercado específico. Por esto, son utilizados una serie de atributos para caracterizar la calidad de la carne, como la terneza, el color, el sabor y la jugosidad. Recientemente, consumidores más conscientes sobre el impacto de la carne en la salud y el bienestar, han agregado a estas variables otros factores, como el contenido de lípidos y colesterol, e incluso ciertas propiedades nutracéuticas, como así también, los sistemas de producción sustentables y de bienestar animal (Scollan y col., 2006).

La carne que llega al consumidor, y por consecuencia sus atributos, está influenciada por una cantidad importante de factores: genéticos, ambientales, y de transporte y procesamiento en toda la cadena. Se han realizado numerosos estudios en bovinos y en otras especies sobre gran parte de estas variables, buscando determinar el efecto de cada factor, y en particular el de los factores genéticos (Behrends y col., 2003; Boles y col., 2004; Dunne y col., 2006; Priolo y col., 2001; Walshe y col., 2006). Sin embargo, en bovinos los efectos genéticos que influyen en el color de la carne han sido poco estudiados. Esto se debe a la gran dificultad que presenta la medición del color de la carne *in vivo* sin dañar al músculo. Además, los factores de procesamiento tienen un gran efecto sobre el color final de la carne, hecho que dificulta la homogeneización de las medidas. No obstante, este atributo es de gran importancia a la hora de formar el precio de la carne, ya que, de todos los atributos percibidos por los sentidos, el color de la carne es el que más influencia ejerce

sobre las decisiones de compra, ya que el consumidor lo toma como indicador de frescura y salubridad al momento de elegir (Mancini y Hunt, 2005). El color rojo cereza brillante es utilizado generalmente como indicador de calidad en la carne fresca, resultado especialmente relevante para el consumidor (Ouali y col., 2006). La importancia económica de este factor fue calculada por Smith y colaboradores (2000) en pérdidas anuales del orden de los 1.000 millones de dólares, ya que un 15% de la carne vacuna pierde valor debido a la decoloración de la superficie.

Existen evidencias a nivel de la industria frigorífica que muestran una variabilidad en el color de la carne entre diferentes individuos independientemente de la raza, edad, pH final, proceso de faena y transporte. En este sentido, los factores genéticos podrían ser responsables de dichas variaciones, como ya fue informado en la carne porcina por Otto y colaboradores (2007). Estos autores encontraron una influencia de varios marcadores genéticos (MC4R, LDHA, GLUT4, HMGA1, CAST) en dos de los parámetros colorimétricos usualmente utilizados. Por lo tanto, un estudio de los genes que influyen en el color final de la carne y en su variabilidad, podría ayudar a la selección de individuos que produzcan carne de mejor color y más estable en el tiempo.

1.2 Bases Bioquímicas del Color de la Carne

De manera general, el color de la carne es el resultado de la distribución espectral de la luz que la ilumina, y de la intensidad de la luz reflejada por su superficie, y depende de la concentración de mioglobina (Mb) y su estado de oxidación, y de la estructura superficial del músculo, directamente relacionada con el pH y el marmoleo, como así también, de la estabilidad de los lípidos presentes y su estado de oxidación.

1.2.1 Los pigmentos del músculo

Las bases bioquímicas del color de la carne están determinadas principalmente por la concentración y estado redox de la mioglobina, hemoglobina, citocromos y otros pigmentos, siendo la Mb el pigmento proteico más importante asociado al color (Tang y col., 2004). Esta proteína sarcoplásmica, de la familia de las globinas, cumple la función de transporte y reserva de oxígeno en el músculo. Está compuesta de 153 aminoácidos, entre los que se destacan los residuos de histidina (His), y cuya estructura terciaria genera un bolsillo hidrofóbico donde se aloja un grupo hemo con un átomo de hierro en su centro. Este hierro puede generar 6 enlaces: cuatro se forman por interacción con el anillo pirrólico a través de átomos de N, otro es ocupado por la His 93 proximal, mientras que la sexta posición genera enlaces reversibles, y es donde se une el O₂ proveniente de la sangre, entre otros posibles ligandos pequeños. Así mismo, la His 64 distal influye estéricamente para la unión de moléculas en este bolsillo hidrofóbico, afectando también de este modo el color (Mancini y Hunt, 2005).

En la carne, la Mb existe principalmente en cuatro formas según el estado de oxidación en el que se encuentra el hierro central y qué ligando esté unido a la sexta posición:

- Deoximioglobina (DeoMb), que está libre de oxígeno y en estado ferroso (Fe⁺²), de color púrpura y presente en la carne envasada al vacío.
- Oximioglobina (OxyMb), con oxígeno unido y en estado Fe⁺², de color rojo cereza.
- Metamioglobina (MetMb), con oxígeno unido y en estado férrico (Fe⁺³), de color marrón.
- Carboximioglobina (COMb), con una molécula de monóxido de carbono (CO) unido en la sexta posición del hierro en estado Fe⁺², de color rojo/rosa brillante.

Una vez faenado el animal, el músculo pasa por diferentes procesos fisicoquímicos hasta convertirse en carne. La **Figura 1** representa las diferentes reacciones relacionadas con el color que suceden durante ese proceso:

1. Oxigenación: cuando la DeoMb se expone al aire, esta une O_2 en la sexta posición libre y forma OxyMb. Adicionalmente, la His 64 distal interacciona con el O_2 ligado alterando la conformación y estabilidad de la proteína.
2. Oxidación: la OxyMb y DeoMb pasan por este proceso, en el que se oxida el Fe^{+2} a Fe^{+3} dando como resultado MetMb. Este proceso depende de diferentes factores, como la presión parcial de oxígeno (pO_2), temperatura, pH, luz, crecimiento microbiano, oxidación lipídica, etc. (Bekhit y Faustman, 2005; Faustman y Cassens, 1990).
3. Reducción: MetMb puede pasar a DeoMb, debido a la acción del sistema enzimático reductor metamioglobina reductasa (MMR), que ocurre con consumo de O_2 y NADH. Estos dos reactivos son consumidos constantemente por el músculo *post mortem*, con lo cual esta reacción queda detenida al cabo de un determinado tiempo. En este sentido, Bekhit y colaboradores (2003) plantearon que la concentración de NADH sería más importante que la actividad de la MMR, para la estabilidad del color de la carne. Alternativamente, la reducción también puede darse por procesos no enzimáticos (Bekhit y Faustman, 2005; Kim y col., 2006).
4. Carboxilación: La presencia de CO en la célula, ya sea como producto del metabolismo o proveniente de la atmósfera, puede provocar su ingreso en la sexta posición de coordinación vacante. Este proceso despierta fundamental interés debido a los nuevos sistemas de *packaging* con atmósferas modificadas (Behrends y col., 2003; McMillin, 2008).

1 (oxigenación): $\text{DeoMb} + \text{O}_2 \rightarrow \text{OxyMb}$

2a (oxidación): $\text{OxyMb} + [\text{consumo de } \text{O}_2 \text{ o baja } P_{\text{O}_2}] - e^- \rightarrow \text{MetMb} + \text{O}_2^-$

2b (oxidación): $[\text{complejo DeoMb-hidroxilo-i3n hidr3geno}] + \text{O}_2 \rightarrow \text{MetMb} + \text{O}_2^-$

3 (reducci3n): $\text{MetMb} + \text{consumo de } \text{O}_2 + \text{actividad MetMb Reductasa} \rightarrow \text{DeoMb}$

4 (carboxilaci3n): $\text{DeoMb} + \text{CO} \rightarrow \text{COMb}$

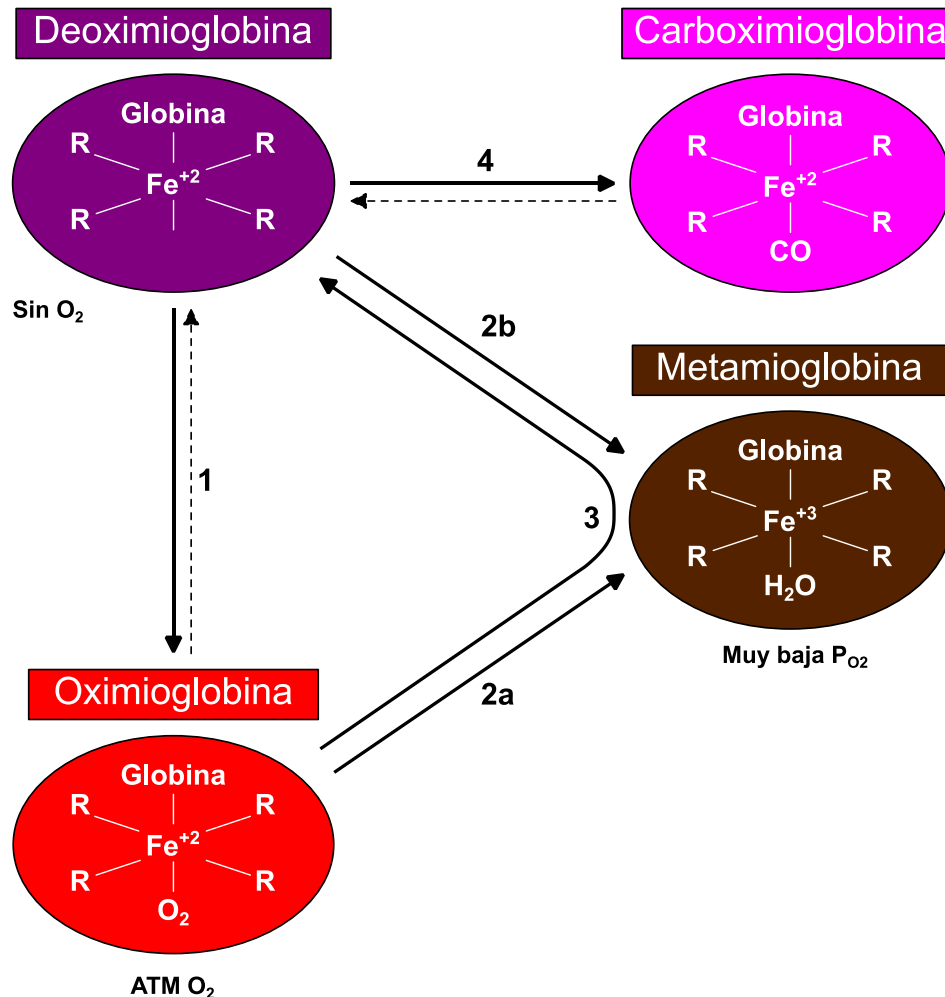


Figura 1. Equilibrios *post mortem* de las diferentes isoformas de la mioglobina. Adaptado de Mancini y Hunt (2005).

La estabilidad de los distintos estados de la Mb ha sido estudiada *post mortem* en relación a la presencia de diferentes metabolitos y productos derivados del catabolismo (Bjelanovic y col., 2016; Faustman y col., 2010; Mancini y Ramanathan, 2008; Mohan y col., 2010). Se ha sugerido que la estructura primaria de la Mb bovina (más rica en His) predispone al ataque nucleofílico por parte de aldehídos derivados de la peroxidación lipídica, cuando se la compara con la Mb porcina. Esta inestabilidad se evidencia en la

formación de aductos en cuatro residuos histidínicos (His 36, 81, 88 y 152; Suman y col., 2007). Por lo tanto, variaciones en el gen de la Mb (BTA5: 74170468 - 74181260¹) podrían ser causantes de diferencias tanto a nivel de estructura primaria (secuencia aminoacídica), como terciaria (conformaciones tridimensionales) de la proteína. Hasta la fecha ha sido reportada muy poca variabilidad en este gen bovino (Castro y col., 2016). Por lo expuesto, este gen podría ser considerado como gen candidato para el estudio de las causas genéticas de las variaciones del color de la carne.

Como se mencionó anteriormente, en la carne se encuentran presentes otros pigmentos además de la Mb. La hemoglobina, es una proteína tetramérica también perteneciente a la familia de las globinas, que está presente principalmente en la sangre dentro de los glóbulos rojos y así llega al músculo. Sin embargo, la concentración dentro del tejido muscular se reduce considerablemente luego del desangrado del animal, por lo que su aporte al color de la carne no es de gran importancia (Suman y Joseph, 2014). Por su parte, los citocromos son proteínas con un grupo hemo al igual que la Mb, y el β -caroteno (precursor de la Vitamina A) es un compuesto lipofílico de la familia de los terpenoides, que es adquirido a través de la dieta. Ambos tienen picos de absorción cercanos a la Mb, y aunque su concentración en la carne es baja, por lo que se podría cuestionar su influencia en el color de la carne (Neethling y col., 2017), su participación en los procesos de oxidoreducción los vuelven relevantes para el estado redox general *post mortem*.

1.2.2 Estado redox celular

Como se mencionó anteriormente, el músculo *post mortem* experimenta una serie de procesos que lo convertirán finalmente en carne. Paralelamente a las reacciones de la Mb, se genera un gran número de cambios a nivel de metabolitos intracelulares. Esto fue estudiado por Faustman y Cassens (1991), quienes midieron la variación en el tiempo de varios compuestos químicos durante la maduración de la carne a 4°C. En el tiempo de

¹ Posiciones según el ensamblado de genoma: Bos_taurus_UMD_3.1.1 ([GCF_000003055.6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003055.6)).

estudio se observó, por un lado, la disminución del contenido de NAD^+ y de los sulfhidrilos no proteicos (NPSH), y por el otro, el aumento del disulfuro de glutatión (GSSG), hipoxantina, xantina, del porcentaje de MetMb, de la relación GSSG/NPSH y del extracto total lipídico.

Aunque los mecanismos correspondientes a estos procesos no han sido completamente explicados, se ha demostrado que los factores más influyentes en la decoloración de la carne son la concentración residual de O_2 y la formación de radicales libres (Ouali y col., 2006). Más aún, ya se ha demostrado que los músculos con mayor consumo de O_2 tienden a decolorarse más rápido (Faustman y Cassens, 1991; Ramanathan y col., 2019). Por su parte, Ledward (1985) consideró que si bien el consumo de O_2 es importante en la estabilidad del color, el factor de mayor importancia sería la actividad enzimática reductora. En este sentido, Seyfert y colaboradores (2006) estudiaron el color de la carne proveniente de diferentes músculos durante 7 días. Esta investigación confirmó que, durante el período analizado, la actividad enzimática reductora de MetMb disminuyó cada día, y conjuntamente, todos los músculos variaron su color hacia tonalidades más oscuras y menos rojas.

Por otro lado, se ha postulado que otros factores que afectan el estado redox de la célula, como los subproductos de la peroxidación lipídica, también intervienen en la decoloración. En este sentido, varios estudios explican que la oxidación de los ácidos grasos insaturados contenidos en la carne deriva en productos primarios y secundarios de elevada reactividad (y en particular el 4-hydroxy-2-nonenal; 4-HNE), incrementando la oxidación de la Mb, y por lo tanto, afectando la estabilidad del color (Chan y col., 1997; Faustman y col., 2010; Suman y col., 2007). Varios autores han comprobado que las dietas y sistemas de producción de los animales también pueden variar el color de la carne. La suplementación con dietas enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados hace que la carne obtenida posteriormente contenga una mayor proporción de estos lípidos, volviéndola más susceptible a la oxidación y aumentando la decoloración (Ladeira y col., 2014). Determinadas dietas suplementadas con antioxidantes, como la Vitamina E (α -tocoferol),

retrasan la peroxidación lipídica y el deterioro del color de la carne (Chan y col., 1998; Faustman y col., 1998), mientras que los sistemas de producción pastoriles y extensivos producen una carne más oscura, entre otros factores, debido a un aumento del poder oxidativo del músculo (Vestergaard y col., 2000).

El glutatión (GSH) es un tripéptido (compuesto por cisteína, glicina y glutamato) con poder reductor que da cuenta del 76% de los NPSH intracelulares de la carne (Faustman y Cassens, 1991). El GSH actúa captando radicales libres, y participa como cofactor en la degradación del H_2O_2 por parte de la peroxidasa, ambos potentes oxidantes (Nelson y Cox, 2000). Además, el GSH puede conjugarse con el 4-HNE y con el 4-hidroxildecenal por acción de las Glutatión S-transferasas (Ålin y col., 1985; Ishikawa y col., 1986). El efecto del GSH sobre la OxyMb bovina fue probado por Tang y colaboradores (2003). Contrariamente a lo esperado, encontraron un aumento de la formación de MetMb por la adición *in vitro* de GSH a pH 7,2 y 25 o 37°C. Sin embargo, cuando el mismo ensayo fue realizado en presencia del citoplasma muscular (en particular, utilizando la fracción de alto peso molecular) el efecto era inverso, es decir, el GSH inhibía la formación de MetMb, por lo que el efecto protector del GSH en el tejido es indirecto. Dentro de las S-transferasas, la Glutatión S-Transferasa P1 (GSTP1) tiene función de detoxificación celular y de resistencia al estrés oxidativo (Lo Bello y col., 2001), y de alguna manera sirve como sensor del estado redox en la célula para la maquinaria apoptótica (Pastore y col., 2003). Más aún, Gelfi y colaboradores (2004) demostraron la sobreexpresión de GSTP1 en personas que viven en altas montañas (Tibet), encontrándose en condiciones de baja pO_2 . En este sentido, como la conversión del músculo en carne es un proceso apoptótico, en el que se genera una pO_2 baja, que descende con el tiempo, resulta que la enzima GSTP1 podría jugar un rol particular en el mantenimiento del poder reductor en el tejido *post mortem*. Por lo tanto, variantes en el gen de la enzima GSTP1 (BTA29: 46087142 - 46090009²) podrían ser responsables de diferencias en la expresión, en la estructura de la enzima, y/o en la actividad enzimática (Deponete, 2013).

² Posiciones según el ensamblado de genoma: Bos_taurus_UMD_3.1.1 ([GCF_000003055.6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003055.6)).

Otra familia de enzimas capaz de utilizar el GSH como sustrato son las Glutatión Peroxidasas. Estas proteínas suelen contar con un residuo de selenocisteína (cisteína modificada con un átomo de selenio), particularmente importante para su actividad de catálisis en la reducción del H_2O_2 . A diferencia del resto de los integrantes de esta familia, que suelen encontrarse en conformaciones diméricas o tetraméricas, la isoenzima GPX4 lleva a cabo su función como monómero, mostrando una elevada preferencia por hidroperóxidos lipídicos, generados en la oxidación de lípidos (Deponte, 2013). De esta manera, ejerce una función de protección celular contra el daño oxidativo, particularmente de los productos de la oxidación de los fosfolípidos de membrana, y previniendo la apoptosis. Adicionalmente, se han detectado variantes de *splicing* para el gen codificante de la GPX4, dando lugar a variantes proteicas con diferentes funciones celulares (Deponte, 2013). Por lo tanto, variantes en el gen de la enzima GPX4 (BTA7: 45205077 - 45207498³) podrían ser responsables de diferencias en la expresión, en la estructura de la enzima, y/o en la actividad enzimática, que podrían influir sobre la determinación del color de la carne.

Por otro lado, durante el proceso de transformación del músculo en carne, y como consecuencia del metabolismo oxidativo de las fibras musculares, se generan gran cantidad de radicales libres, entre los que se encuentra el radical superóxido, O_2^- (Falowo y col., 2014). Este radical es captado por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) y transformado en H_2O_2 . Sin embargo, la actividad de esta enzima es altamente dependiente del cobre, que actúa como cofactor. Más específicamente, la actividad depende de la presencia de la enzima CCS (por *Copper Chaperone for Superoxide Dismutase*), que capta y entrega átomos de cobre directamente a la SOD, activándola (Wong y col., 2000). Por lo tanto, las variantes en el gen de la enzima CCS (BTA29: 45274362 - 45288128⁴) podrían ser responsables de diferencias en la expresión, en la estructura de la enzima, y/o en la actividad enzimática, alterando la unión del Cu o la interacción con SOD, influenciando el estado redox en la carne.

³ Posiciones según el ensamblado de genoma: Bos_taurus_UMD_3.1.1 ([GCF_000003055.6](#)).

⁴ Posiciones según el ensamblado de genoma: Bos_taurus_UMD_3.1.1 ([GCF_000003055.6](#)).

Finalmente, la enzima Lactado Deshidrogenasa (LDH) cataliza la interconversión reversible de piruvato en lactato, utilizando en este proceso NADH como reductor. Dado que el NADH es la principal fuente de poder reductor con la que cuenta la carne (Ramanathan y Mancini, 2018), y que *post mortem* el equilibrio se direcciona hacia la regeneración del NADH debido al exceso de ácido láctico (junto a la acumulación de metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; Faustman y Suman, 2017), la actividad de LDH se vuelve un factor de gran importancia para el estado redox celular en la carne. La enzima LDH es una proteína tetramérica compuesta por los polipéptidos A y/o B (codificados por dos genes estructurales diferentes, LDHA y LDHB), de manera que se pueden formar cinco isoenzimas, LDH-1 a -5. El homo-tetrámero LDH-A (o LDH-5) tiene la mayor velocidad máxima de reacción y se encuentra en el músculo esquelético glucolítico, favoreciendo la formación de lactato a partir de piruvato. Por el contrario, el homo-tetrámero LDH-B (o LDH-1) se encuentra en gran cantidad en el músculo cardíaco oxidativo, dirigiendo la reacción hacia la formación de piruvato y NADH (Kim y col., 2006). Nuevamente podemos considerar que variantes en el gen del polipéptido LDHA (BTA29: 26543855 - 26555892⁵) podrían ser responsables de diferencias en la expresión, en la estructura del monómero y/o en la conformación del tetrámero, y/o en su actividad enzimática en la carne.

1.2.3 Descenso del pH *post mortem*

El valor de pH final en la carne y la curva de descenso de pH son otros factores de gran importancia para el color (y para la calidad en general). La acidificación ocurre como consecuencia del metabolismo glucolítico aún activo en el músculo *post mortem*, ya que continúa con la degradación del glucógeno almacenado. Las condiciones de anaerobiosis generadas por la pérdida del suministro de oxígeno por vía sanguínea, produce la acumulación de ácido láctico y el consecuente descenso del pH en el músculo (Huff Lonergan y col., 2010). De esta manera, la concentración de glucógeno disponible

⁵ Posiciones según el ensamblado de genoma: Bos_taurus_UMD_3.1.1 ([GCF_000003055.6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003055.6)).

determinará tanto la velocidad de descenso como el pH final luego de la muerte (Przybylski y Hopkins, 2015). Si el nivel de glucógeno es el adecuado (aproximadamente 40 - 50 mmoles de glucosa por kg de músculo), el músculo alcanza un pH final de 5,5 a las 48 horas (Swan y Boles, 2002). En este punto, las fibras musculares pierden la capacidad de utilizar el oxígeno disponible, permitiendo de esta manera que la Mb permanezca en la forma OxyMb, favoreciendo que la carne adopte un color rojo brillante (Gardner y col., 2014). Por el contrario, bajos niveles de glucógeno muscular pueden disminuir la velocidad del descenso de pH, o generar un pH final alto (5,8 - 6,0), dando carnes más oscuras (Della Rosa y col., 2017).

Adicionalmente, el descenso del pH *post mortem*, junto con la baja temperatura de almacenamiento de la carne (alrededor de los 4°C), favorece la acción del sistema proteolítico de las calpaínas (Rhee y col., 2006). Además de generar la desorganización de la estructura del tejido muscular, que lleva a la tiernización de la carne, este sistema degradará los sistemas enzimáticos aún activos y los pigmentos proteicos, influyendo por lo tanto en el color de la carne.

1.3 Los Sistemas de Producción y el Color

Entre los factores pre-faena que influyen sobre los parámetros de calidad de la carne, el sistema de producción es uno de los principales. En Argentina, el sistema de producción de carne ha ido variando a lo largo de los años, encontrando hoy sistemas extensivos pastoriles (con o sin suplementación) y sistemas intensivos confinados, que conviven en las distintas regiones del país, con predominancia del sistema de producción por pastoreo (Mutti, 2018; Pighin y col., 2016).

De manera general, se atribuyen mejores parámetros sensoriales (color, terniza, jugosidad) a las carnes que provienen de sistemas confinados. Esta "mejora" podría deberse a un efecto indirecto gracias a un mayor grado de engrasamiento, mayor tasa de crecimiento y menor edad de los animales terminados en este sistema (Mutti, 2018). Por su parte, los

animales provenientes de sistemas pastoriles presentan, al momento de la faena, mayor edad, actividad física y estrés, que han sido asociados con mayores niveles de Mb y que suelen dar carnes más oscuras, en comparación con aquellos provenientes de sistemas de confinamiento (Dunne y col., 2006; Priolo y col., 2001). A medida que la edad de un animal avanza, aumenta la concentración de Mb en el músculo para compensar la pérdida de afinidad por el oxígeno, dando carnes más rojas y oscuras (Seideman y col., 1984).

Por otro lado, el tipo de alimentación que tengan los animales afectará el nivel de las reservas de glucógeno en el músculo (Przybylski y Hopkins, 2015), lo cual influirá, como se mencionó en la sección previa, sobre la tasa de descenso de pH y su valor final. De esta manera, la dieta del sistema pastoril genera un bajo depósito de glucógeno muscular. Esto puede disminuir la velocidad del descenso del pH *post mortem* o incluso no permitir que se alcancen los valores de pH final deseados, obteniendo valores superiores a 5,8 - 5,9 y ocasionando en consecuencia cortes más oscuros (Pethick y col., 2000), mostrando la relación que existe entre el pH final y el color de la carne. Por el contrario, las condiciones de engorde a corral presentan dietas con altos niveles de energía que permiten incrementar las reservas de glucógeno en el músculo y de esta manera lograr un adecuado descenso del pH (Immonen y col., 2000).

Adicionalmente, el glucógeno remanente *post mortem* depende de la cantidad utilizada durante la fase previa al sacrificio, relacionándose con el estrés que sufre el animal y la consecuente liberación de adrenalina (Gardner y col., 2014). Así, los animales provenientes de sistemas pastoriles presentan mayor predisposición al gasto energético por estrés pre-faena, en comparación a los sistemas de confinamiento, en los que una mayor exposición y acostumbamiento a la presencia del hombre generan menor gasto energético por estrés (Priolo y col., 2001). En consecuencia, esto también influirá en el pH final de la carne, siendo mayor en animales de origen pastoril.

Otro factor de importancia es el contenido en la carne de antioxidantes, como la vitamina E, que brindan estabilidad al color previniendo la peroxidación lipídica. Diferentes autores han demostrado que la concentración de vitamina E en el músculo de animales

alimentados con pasturas es significativamente mayor que en el ganado alimentado con un concentrado sin suplementar con vitamina E (Gatellier y col., 2005; Yang y col., 2002).

Adicionalmente, el color de la grasa también influye en la decisión de los consumidores al momento de elegir, y se ha estudiado que las variaciones que se presentan son consecuencia principalmente de la dieta (Troy y Kerry, 2010). La grasa pasa del blanco hacia una coloración amarillenta cuando se utiliza forraje como principal fuente de alimento. En este sentido, Dunne y colaboradores (2009) informaron que los pastos y forrajes verdes aportan carotenoides, que al ser incorporados regularmente a la dieta producen grasa de color amarillo. Por el contrario, los granos presentan niveles de carotenos muy inferiores a los de las pasturas (Realini y col., 2004), por lo cual los individuos criados en sistemas intensivos y alimentados con concentrado, presentan grasa de tonalidad más blanca, teniendo las tonalidades amarillentas una relación inversamente proporcional a la cantidad de concentrado de la dieta (French y col., 2000). A pesar de no afectar el sabor de la carne, una coloración amarillenta de la grasa intramuscular es menos apreciada por los consumidores, que prefieren en general grasa de color blanco (Troy y Kerry, 2010).

Finalmente, otro factor pre-faena de importancia que influye sobre la calidad de la carne es la raza a la que pertenezcan los individuos. Existen dos subespecies que dieron origen a las distintas razas de bovinos: *Bos taurus* (que incluye las razas europeas) y *B. indicus* (del sur del continente asiático, luego llevado a África y las costas europeas del Mediterráneo), y que presentan diferentes características. Las razas británicas son razas taurinas que se caracterizan por ser animales sumamente precoces que pueden depositar grasa subcutánea de acuerdo a su alimentación a cualquier edad, se adaptan a zonas templadas y templadas frías, y presentan una muy buena calidad carnicera dando reses de buen rendimiento. Son las que mejor se posicionan al evaluar los parámetros de calidad. Por otro lado, las razas cebuinas (*B. indicus*) se diferencian de las europeas por la giba que presentan en la cruz, la gran papada que forma su piel, y el prepucio y el ombligo pendulosos. Como consecuencia de la selección natural y artificial existen muchas razas diferenciadas por su tamaño, conformación, pelaje, etc. En general comparten que están

adaptadas a climas calurosos y húmedos, no resistiendo el frío intenso, y presentan resistencia a condiciones de estrés hídrico, viéndose menos afectado el consumo de alimento frente a la falta de agua. Finalmente, poseen una calidad carnicera regular y un rendimiento bueno (Crouse y col., 1989).

De esta manera, al igual que otros parámetros de calidad, el color de la carne también puede variar con la raza (Ripoll y col., 2012). Esto se da principalmente como consecuencia de diferencias en la concentración de Mb en la carne, en donde animales con mayores aptitudes carniceras y más musculosos mostraron concentraciones más altas de pigmento, dando carnes más oscuras (Aldai y col., 2006). Estos estudios mostraron además un efecto significativo del tipo biológico sobre el parámetro colorimétrico que mide la luminosidad.

1.4 Genética y Marcadores Moleculares

Desde los comienzos de la domesticación, el hombre ha seleccionado los animales basándose en los fenotipos observables y/o medibles de cada individuo. La existencia de diferencias entre individuos y entre razas ha permitido obtener animales con características deseables, diferentes según la zona, el tipo y objetivo de producción. Durante el siglo XX, el desarrollo de modelos matemáticos, la genética cuantitativa y la computación, han permitido un gran avance, celeridad y exactitud en los resultados de los programas de selección (Henderson y Quaas, 1976; Kirkpatrick y Heckman, 1989; Mrode, 2005). Sin embargo, este tipo de selección se encuentra a menudo con diversas dificultades: i) la heredabilidad de muchos caracteres (mayoritariamente cuantitativos) suele ser baja, ii) algunos caracteres no son medibles en etapas tempranas, o *in vivo*, o en animales de ambos sexos. Por último, y pese a su demostrada eficiencia, la selección fenotípica no contempla completamente la variabilidad genética, ni las complejas interacciones génicas que dan como resultado los caracteres cuantitativos.

La biología molecular desde sus comienzos, ha buscado establecer relaciones entre diferentes marcadores (grupos sanguíneos, polimorfismos proteicos, *fingerprintings*, microsatélites, etc.) y caracteres productivos, para usarlos como predictores del valor de cría del animal, y por lo tanto, como herramientas para la selección (Andersson-Eklund y col., 1990; Doff y col., 1991; Georges y col., 1993). A partir del desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han utilizado un amplio rango de técnicas para el estudio del polimorfismo genético en bovinos (Singh y col., 2014). Más recientemente, el desarrollo de nuevas tecnologías de alta performance (Pirosecuenciación, TaqMan, microarray) han permitido el estudio de un elevado número de marcadores genéticos en grandes poblaciones de individuos (Kuimelis y col., 1997; Ronaghi, 2001; Sobrino y col., 2005), y con ello el desarrollo de la Selección Asistida por Marcadores (MAS, por *Marker Assisted Selection*) y la selección genómica (VanRaden y col., 2009).

El fin último de la genómica es conocer cuántos genes integran el genoma, cómo actúan estos, cómo está regulada su función y cómo interaccionan entre sí, para dar el fenotipo final del individuo. En el caso particular de la genética zootécnica, el objetivo es conocer aquellos genes responsables de caracteres de importancia económica, y estar en condiciones de utilizarlos para mejorar la producción (mayor número de animales y más resistentes, cantidad y calidad de la carne por animal, etc.). Desde la generación del mapa de ligamiento bovino (Barendse y col., 1994), los marcadores de ADN se han utilizado para identificar *loci* o regiones cromosómicas (QTL, por *Quantitative Trait Loci*) que afectan tanto a caracteres cualitativos como cuantitativos. El marcador puede estar asociado a un gen mayor, ligado a éste o a varios genes con efectos aditivos. En este sentido, los marcadores moleculares presentan una gran ventaja desde el punto de vista de la selección, pues tienen una segregación simple, son co-dominantes, su determinación es exacta, simple y puede realizarse a partir de la etapa embrionaria de un individuo.

Existen dos estrategias usualmente seguidas para encontrar genes o regiones responsables de una característica dada: la detección de QTLs y el estudio de genes candidatos. La detección de QTLs requiere un gran número de registros fenotípicos y

generalmente se utiliza en caracteres de medición rutinaria, como el peso, altura, pelaje, cuernos, etc.; mientras que el estudio de genes candidatos se utiliza generalmente en características que no tienen una medición rutinaria, como la terneza, color de carne, marmoleo, etc. (Dekkers, 2004). La metodología de MAS aprovecha los polimorfismos genéticos y la asociación de sus alelos con caracteres de importancia económica para ser usados en la selección de individuos. De este modo, la MAS podría tener un impacto teórico del 5 al 20%, principalmente en caracteres donde la selección cuantitativa encuentra dificultades, como ser caracteres no medidos rutinariamente, o medibles tardíamente, o *post mortem*, o en animales de un solo sexo (Weller, 2007). Aunque actualmente la selección genómica ha reemplazado la metodología de MAS, algunos autores han propuesto modelos de selección genómica que incluye la información de los QTLs, y sostienen que la integración de ambas estrategias aumentaría la precisión de las estimaciones (Arruda y col., 2016; Zhao y col., 2014). Por otra parte, la detección de QTLs, ya sea mediante rastreo genómico o por genes candidatos, permite aumentar los conocimientos sobre la determinación de caracteres de importancia económica y de esta forma utilizar la información obtenida para mejorar los sistemas de producción (por ejemplo, modificando la dieta de los animales).

1.5 Estudios *in silico*

El desarrollo de las tecnologías de alta performance durante la última década produjo un aumento exponencial en la cantidad de información disponible sobre los sistemas biológicos. El crecimiento de las “ómicas” permitió la detección de variantes en componentes moleculares a diferentes niveles (Schneider y Orchard, 2011). De esta manera, a partir de una muestra puede obtenerse información de la estructura y variantes de su genoma, de los patrones de expresión de genes y proteínas, y de la concentración y el flujo de los metabolitos, entre otros (Field y col., 2009). El área de producción animal no es la excepción, y hoy día existe la necesidad de integrar la información proveniente de estudios

de proteómica, genómica, transcriptómica y metabolómica (Reed y col., 2004; Thamsen y Jakob, 2011; Wang y col., 2018). Con respecto a este amplio espectro y cantidad de información, el incremento de resultados falsos positivos ya ha sido probado y discutido (Benjamini y Hochberg, 1995; Marino, 2018), motivo por el cual la validación de los descubrimientos propuestos resulta esencial (Ioannidis y Khoury, 2011). Consecuentemente, identificar aquellos casos que vale la pena estudiar con profundidad, separándolos de resultados falsos positivos, es un proceso desafiante. En este sentido, los estudios por métodos *in silico* pueden ayudar a identificar y priorizar resultados para futuras validaciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

En particular, las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por *next-generation sequencing*) pueden identificar enormes cantidades de variantes en la secuencia. Sin embargo, el estudio de esa enorme cantidad de datos en un sistema biológico puede ser un proceso muy difícil y costoso. Por el contrario, las metodologías de análisis *in silico* resultan fáciles de implementar, económicas, confiables y con un ahorro de tiempo importante (Singh y Mistry, 2016), ofreciendo una alternativa factible para evaluar el potencial efecto de las variantes a nivel de ADN. Particularmente, en el caso de las sustituciones aminoacídicas, dado que estas técnicas se basan en consideraciones sobre la secuencia y estructura de las proteínas, pueden ayudar a predecir los cambios fenotípicos que resultan de la variación genómica. En estos polimorfismos no sinónimos (nsSNP, por *non-synonymous SNPs*), al modificarse la secuencia se podrían tener diversos efectos sobre las propiedades de la proteína, pudiendo afectar su estabilidad, la actividad catalítica y/o la interacción con otras moléculas, por lo que surge la necesidad de clasificar las variantes funcionalmente relevantes. Por lo tanto, nuestra capacidad para seleccionar aquellos nsSNPs relevantes para realizar estudios experimentales puede potenciarse implementando en una instancia preliminar estudios *in silico*, analizando el potencial impacto que puedan tener las variantes aminoacídicas sobre la estructura y función de las proteínas (Masoodi y col., 2012). En este sentido se han desarrollado diversos métodos de predicción de libre acceso, cada vez más sofisticados y eficientes, para evaluar el impacto de los nsSNPs

(Priya Doss y col., 2014). En su mayoría, los algoritmos utilizan información filogenética de secuencias (es decir, la conservación de los residuos durante la evolución) y características estructurales de las proteínas, o una combinación de ambas, junto a las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, para realizar la clasificación y evaluar el impacto de las sustituciones sobre la estructura y función de las proteínas.

Por otro lado, conocer la estructura tridimensional de las proteínas es una parte muy importante en la determinación del impacto de las mutaciones, ya que se logran determinar los cambios que generan las mismas en su ambiente cercano (Priya Doss y col., 2014). De esta manera, las herramientas de modelado de estructuras proteicas (ya sea por homología, por métodos *ab initio*, o la combinación de ambos), permiten obtener modelos del plegamiento tridimensional de proteínas aun no cristalizadas, y mapear tridimensionalmente en dichos modelos los residuos aminoacídicos de interés y evaluar sus sustituciones en el contexto estructural en el que se encuentran. Sin embargo, estas metodologías aportan un modelo de una única configuración estructural relativamente rígida. Esta imagen que se tenía inicialmente de las proteínas ha sido reemplazada por modelos dinámicos, en los cuales los movimientos internos y los cambios conformacionales juegan un papel esencial en su función (Karplus y McCammon, 2002). Por este motivo es que la simulación de dinámicas moleculares (DM) se ha vuelto una herramienta muy importante para comprender el comportamiento biológico de las macromoléculas, brindando información sobre las bases físicas de su estructura y función. Esta metodología se basa en la simulación del movimiento de los átomos interaccionando entre sí, siguiendo las ecuaciones de Newton de movimiento de la física clásica. Así, estas simulaciones sirven como un microscopio computacional, que permite determinar mecanismos moleculares a escalas espaciales y temporales que resultarían difícilmente observables experimentalmente (Dror y col., 2012).

1.6 Interacción entre Caracteres Fenotípicos: Modelos de Ecuaciones Estructurales

En los sistemas de producción y cría de animales basados en múltiples caracteres fenotípicos, como aquellos dedicados al mejoramiento de la calidad de la carne, es de gran importancia estudiar sus potenciales relaciones funcionales (Inoue y col., 2016). Tradicionalmente, esto se realiza utilizando modelos estándares de múltiples caracteres, que analizan los efectos entre las variables, dando en general resultados satisfactorios. Sin embargo, estos modelos no permiten predecir con precisión cómo cambiarían dichos efectos como resultado de intervenciones externas (Rosa y col., 2011). Alternativamente, se ha utilizado el modelado de sistemas de ecuaciones estructurales (SEM, por *Structural Equations Modeling*) para analizar las relaciones entre caracteres fenotípicos en sistemas con múltiples variables, ofreciendo una interpretación de dichas relaciones a través de redes de efectos causales entre variables. En los modelos tradicionales todas las relaciones se representan a través de asociaciones lineales simétricas entre variables aleatorias (medido como covarianzas y correlaciones), sin embargo, en las SEM una variable puede ser tomada como el predictor de otro carácter, proporcionando un vínculo funcional (causalidad) entre ambas (Rosa y col., 2011). Adicionalmente, las SEM permiten diferenciar entre los efectos directos e indirectos entre las variables, mientras que los efectos derivados de los modelos tradicionales integran ambas relaciones en un único parámetro, perdiéndose dicha información del sistema (Cha y col., 2017; Inoue y col., 2016). En conclusión, obtener información relativa a las redes de interacción causal entre variables puede ser utilizado para entender y predecir el comportamiento de sistemas biológicos complejos, como es el color de la carne, permitiendo mejorar las prácticas de manejo y las estrategias de selección por múltiples rasgos en el ganado.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivos generales

El objetivo general de la presente tesis doctoral consistió en analizar la variabilidad genética en genes involucrados en la determinación del estado redox celular muscular y estudiar su efecto sobre el color de la carne en bovinos, con el fin de generar conocimiento acerca del control genético de los caracteres asociados al color de la carne. Esto permitirá desarrollar tecnologías genéticas, basadas en el análisis de ADN, que orienten a la selección para optimizar la calidad de carne y aumentar su valor, en respuesta a las demandas de los mercados modernos.

1.7.2 Objetivos específicos

- Evaluar la asociación de polimorfismos de ADN (SNPs, por *single nucleotide polymorphisms*) reportados en genes candidatos seleccionados [Mioglobina (Mb), Lactato Deshidrogenasa A (LDHA), Glutación S Transferasa 1 (GSTP1), Glutación peroxidasa 4 (GPX4) y Chaperona del Cobre para la Superóxido Dismutasa (CCS)] con parámetros colorimétricos medidos (L^* , a^* , b^*) y calculados (ángulo Hue y Croma).
- Identificar polimorfismos de ADN en los genes candidatos que hayan resultado en una asociación positiva mediante la estrategia de re-secuenciación.
- Evaluar el efecto de las mutaciones encontradas sobre la expresión, la estructura de las proteínas y su actividad, a través de análisis bioinformáticos y/o ensayos *in vitro*.
- Aplicar modelos de ecuaciones estructurales (SEM) para evaluar la causalidad de diferentes variables aleatorias sobre los parámetros de color de la carne.
- Desarrollar técnicas de alto rendimiento (Microarrays) para los polimorfismos encontrados y/o previamente reportados en los genes candidatos seleccionados.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recursos Animales y Muestreo

En el presente trabajo se emplearon distintos grupos de muestras y animales para cumplir con los objetivos propuestos. El primer grupo (G-I), contó con un total de 179 novillos provenientes de un proyecto previo de evaluación de estrategias de suplementación y sistemas de cruce en la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA Balcarce, Argentina; Villarreal y col., 2006). En el período de engorde los animales fueron alimentados en pasturas a base de *Lolium multiflorum*, *Dactylis glomerata*, *Bromus catarticus*, *Trifolium repens* y *Trifolium pretense*. En los casos en que las fluctuaciones estacionales en el crecimiento o la calidad de las pasturas pudiera alterar una ganancia de peso sostenida, los animales fueron suplementados con maíz y fardo para cubrir los requerimientos nutricionales, de acuerdo con el *National Research Council* de EEUU (NRC, 2000). Este grupo de muestras se utilizó para realizar un primer análisis exploratorio de la asociación de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) previamente reportados, con parámetros de color de la carne; estos polimorfismos estaban presentes en un grupo de genes candidatos propuestos (ver más adelante, Sección 2.4.1). El muestreo se realizó durante las faenas de novillos nacidos entre los años 2006 y 2009 que tenían entre 15 y 18 meses de edad. Los novillos pertenecían a diferentes grupos genéticos, incluyendo: Angus puros (An, n=29), Hereford puros (He, n=15), cruza F1 ($\frac{1}{2}$ An- $\frac{1}{2}$ He, n=35), cruza F2 ($\frac{1}{2}$ An- $\frac{1}{2}$ He, n=26; $\frac{3}{4}$ An- $\frac{1}{4}$ He, n=29; $\frac{3}{4}$ He- $\frac{1}{4}$ An, n=23) y un grupo obtenido por apareamiento de toros Limousin (Li) con vacas F1 ($\frac{1}{2}$ Li- $\frac{1}{4}$ An- $\frac{1}{4}$ He, n=22) (**Tabla 1**). El valor de esta población reside en la disponibilidad de información confiable en términos de datos fenotípicos, de manejo y del contexto genético de los animales. Todos los procedimientos experimentales en los que se utilizaron animales se llevaron a cabo de acuerdo con el Manual de Procedimientos sobre el Bienestar Animal del SENASA.

El segundo grupo (G-II) estuvo compuesto por 36 muestras aportadas por la Cátedra de Producción Bovina de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de

La Plata (UNLP), pertenecientes a las razas Angus (An, n=7), Holando (Ho, n=6), Murray (Mu, n=7), y cruza Wagyu x Angus (WaxAn, n=6) y Wagyu x Holando (WaxHo, n=10) (**Tabla 1**). Todos los animales usados en este experimento fueron mantenidos en similares condiciones de pastoreo antes de comenzar el período experimental, en el campo Don Joaquín de la UNLP (ubicado en la localidad de General Mansilla, Partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires). La alimentación fue en base a pasturas consorciadas implantadas el año anterior con diferentes variedades de Festuca (Mediterranea y Continental) y Agropiro, y mezcla de leguminosas (Trebol Rojo, Trebol Blanco, *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*). Posteriormente, los animales fueron trasladados al campo Santa Catalina de la UNLP (ubicado en la localidad de Llavallol, Partido de Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires), para ser terminados en condiciones de encierre. Se diseñaron y armaron corrales individuales de 32 m² con cinta electro plástica, cada uno con su respectivo bebedero y comedero. Todos los corrales quedaron ubicados al reparo de árboles, evitando situaciones de estrés con condiciones climáticas adversas. Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos que recibieron una suplementación con Lino (n=19) y Soja (n=17), respectivamente. Al igual que para G-I, las muestras de G-II contaban con información confiable en términos de datos fenotípicos, de manejo y del contexto genético de los animales, ya que fueron obtenidas en el marco experimental de la tesis doctoral del Dr. Federico Mutti: “Incorporación de Lino en la Dieta de Bovinos y su Efecto Sobre la Calidad de la Carne y Performance Reproductiva” (Mutti, 2018).

Adicionalmente, para caracterizar la variabilidad genética e identificar nuevos SNPs en el gen de la Glutación S-Transferasa P1 (GSTP1) mediante la estrategia de re-secuenciación se utilizó un panel con 14 muestras provenientes del Banco de Muestras de ADN del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, FCV-UNLP-CONICET; <http://www.igevet.gob.ar>). Este panel estaba compuesto por muestras pertenecientes a diferentes razas bovinas con diferente capacidad carnicera criadas alrededor del mundo, incluyendo: Angus (An, n=2), Brahman (Br, n=2), Criollo (Cr, n=2), Hereford (He, n=2), Holando (Ho, n=2), Nelore (Ne, n=2) y Wagyu (Wa, n=2). De la misma manera, se armó un

nuevo panel con muestras del grupo G-II (An, n=2; Ho, n=2; WaxAn, n=2; WaxHo, n=2) y muestras provenientes del Banco de Muestras de ADN del IGEVET (He, n=2; Br, n=2), para caracterizar la variabilidad genética e identificar nuevos SNPs en el gen de la cadena A de la Lactato Deshidrogenasa (LDHA) mediante la estrategia de re-secuenciación.

Tabla 1. Poblaciones animales experimentales utilizadas.

Grupo	Raza/Cruza	Grupo Genético	N	Grupo	Raza/Cruza	Grupo Genético	N
G-I	Angus	An	29	G-II	Angus	An	7
	Hereford	He	15		Holando	Ho	6
	Cruza F1	$\frac{1}{2}\text{An}-\frac{1}{2}\text{He}$	35		Murray	Wa	7
		$\frac{1}{2}\text{An}-\frac{1}{2}\text{He}$	26		Wagyu x A	WaxAn	6
	Cruza F2	$\frac{3}{4}\text{An}-\frac{1}{4}\text{He}$	29		Wagyu x Ho	WaxHo	10
		$\frac{3}{4}\text{He}-\frac{1}{4}\text{An}$	23			TOTAL	36
	Limousin x F1	$\frac{1}{2}\text{Li}-\frac{1}{4}\text{A}-\frac{1}{4}\text{He}$	22				
			TOTAL				
			179				

2.2 Muestras de Carne y Determinaciones Fenotípicas

2.2.1 Determinaciones fenotípicas del grupo G-I

Con el fin de caracterizar la carne de los novillos pertenecientes al grupo G-I se evaluaron tanto parámetros colorimétricos como la composición de ácidos grasos. Estas variables se utilizaron posteriormente para llevar a cabo los estudios de asociación con los marcadores genéticos correspondientes a los genes candidatos propuestos para color de carne.

2.2.1.1 Muestreo

Luego de la faena, se extrajeron de la carcasa los bloques de carne ubicados entre la 11ª y 13ª costilla correspondientes al músculo *Longissimus dorsi* (LD), se deshuesaron y congelaron hasta su procesamiento para las determinaciones analíticas realizadas en el Laboratorio de Carnes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA) (Mazzucco y col., 2010).

2.2.1.2 Mediciones asociadas al color de la carne

La determinación de los parámetros colorimétricos (L^* : luminosidad; a^* : abundancia del rojo; b^* : abundancia del amarillo) se realizó sobre el músculo LD expuesto siguiendo el sistema de medición de color CIELAB (CIE, 2004), mediante espectrofotometría de reflectancia difusa, utilizando un colorímetro triestímulo Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japón). En este método de tres coordenadas, L^* mide la luz reflejada y está asociado a la luminosidad (0 a 100 de luz completamente absorbida a completamente reflejada), a^* mide gradaciones del rojo (positivo) al verde (negativo), y b^* mide gradaciones del amarillo (positivo) al azul (negativo) (Priolo y col., 2001). Previo a las mediciones, el colorímetro fue calibrado contra un estándar blanco provisto por el fabricante. El colorímetro tiene un área de medida de 8 mm de diámetro y utiliza una fuente de iluminación de D_{65} y a 0° de un observador estándar. Las determinaciones se realizaron sobre bifes de 2,5 cm de ancho luego de haber sido incubados durante 1 hora a 4°C para su oxigenación. El valor registrado para los parámetros se obtuvo a través del promedio de tres medidas realizadas sobre superficies libres de tejido conectivo o grasa intramuscular. También se calcularon los parámetros Croma (C_{ab}^*), relacionado a la intensidad del color y considerado un buen parámetro para caracterizar los cambios de color (aumenta al aumentar a^* o b^* , y disminuye en presencia de tonalidades marrones) (Renerre y Mazuel, 1985), y el ángulo Hue (h_{ab}), que es una medida de la divergencia del eje rojo puro

(relacionado al cambio en el color de rojo a amarillo) (Hunter y Harold, 1987). Estos parámetros se calculan según las siguientes ecuaciones:

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$h_{ab} = \arctan \frac{b^*}{a^*}$$

Por su parte, el pH del músculo se midió usando un pHmetro portátil, con un electrodo de penetración con compensación automática de temperatura Testo 230 (Testo GMBH & Ltd., Japón), calibrado con buffers de pH 4,0 y 7,0. Se registraron tres medidas de pH por muestra de carne cruda, a una profundidad constante y abarcando todo el largo del músculo. El resultado correspondiente a cada muestra se obtuvo promediando las tres mediciones.

2.2.1.3 Mediciones asociadas al contenido graso de la carne

La extracción total de lípidos de las muestras de carne se realizó de acuerdo a la técnica de Folch (Folch y col., 1957), que consiste en la purificación por metilación alcalina y su posterior recuperación en hexano. La composición de ácidos grasos se determinó con un cromatógrafo gaseoso GC14B (Shimadzu Corp., Tokyo, Japón). La separación de metil-ésteres de ácidos grasos (FAMES) se llevó a cabo utilizando una columna capilar de 100 m x 0,25 mm (Restek, Bellefonte, Pennsylvania, EEUU). El cromatógrafo se programó a una temperatura de 140°C durante un minuto, incrementando la temperatura hasta 240°C a razón de 4°C por minuto, y luego manteniéndola constante durante 20 minutos. El inyector y el detector se mantuvieron a 260°C. Los datos se obtuvieron mediante el software GCSolution (Shimadzu Corp.). La cantidad de cada ácido graso se determinó por la técnica de estándar interno (Supelco 37 FAME MIX, Sigma-Aldrich Co. LLC.) y se expresó como porcentaje de ácidos grasos totales, como así también, la proporción de ácidos grasos mono-insaturados (AGMI), poli-insaturados (AGPI) y saturados (AGS). El contenido de grasa

intramuscular total se determinó como la cantidad de grasa en 100 gramos de músculo fresco recuperada como extracto etéreo (EET), excluyendo el tejido adiposo externo.

2.2.2 Determinaciones fenotípicas del grupo G-II

2.2.2.1 Mediciones ecográficas de calidad de carcasa

En el caso del grupo G-II, durante el encierre de 100 días se realizaron pesajes y ecografías para evaluar el crecimiento de los animales. Los pesajes se realizaron cada 14 días con una balanza electrónica digital VESTA, sin ayuno previo y, en cada oportunidad, en dos días consecutivos, tomándose luego el promedio de ambas pesadas. Las determinaciones ecográficas fueron realizadas con un equipo Aquila Pro Vet, para evaluar el Área Ojo de Bife (AOB) expresada en cm^2 , el Espesor de Grasa Dorsal (EGD) expresada en mm, y Porcentaje de Grasa Intramuscular (PGI). Las medidas de AOB y EGD son datos de cantidad de carne y grasa, mientras que PGI es un dato de calidad. Para AOB y EGD, la imagen se tomó entre la 12ª y 13ª costilla sobre el lomo, obteniendo una imagen transversal del músculo LD ubicando el transductor en forma perpendicular al animal, y se realizaron las mediciones del bife y la grasa dorsal, en la $\frac{3}{4}$ partes del ancho del bife. Para la medición de PGI se ubicó el transductor entre la 12ª y 13ª costilla en forma longitudinal, paralelo al raquis, sobre el músculo LD, guardándose 3 imágenes de cada novillo que luego fueron procesadas mediante el software desarrollado por Iowa State University y comercializado por la empresa Biotronics Inc. de Iowa, Estados Unidos.

2.2.2.2 Muestreo

Luego de la faena se extrajeron de la carcasa bloques de bifes correspondientes al músculo LD (entre la 8ª y 13ª costilla) para llevar a cabo las determinaciones fenotípicas en el Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) dependiente del Centro de Investigaciones de Agroindustria (CIA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en la

localidad de Hurlingham (Provincia de Buenos Aires), donde fueron almacenados y congelados hasta su procesamiento.

2.2.2.3 Mediciones asociadas al color de la carne

La determinación de los parámetros colorimétricos se realizó sobre el músculo LD expuesto siguiendo el sistema de medición de color CIELAB (CIE, 2004), mediante un espectrofotómetro BYK-Gardner con un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japón), con iluminante D₆₅ y a 2° del observador. En este caso, las determinaciones se realizaron por sextuplicado tanto sobre el músculo como sobre la grasa de muestras expuestas previamente al aire por 1 hora para un correcto desarrollo del color. Por su parte, el pH del músculo se midió usando un pHmetro (Thermo Orion, EEUU), con un electrodo de combinación estandarizado, calibrado con buffers de pH 4,0 y 7,0. El electrodo se insertó en el núcleo de la sección del músculo LD paralelo a sus fibras musculares.

2.2.2.4 Mediciones asociadas al contenido graso de la carne

Para la determinación de los lípidos totales y del perfil de ácidos grasos, se tomaron muestras de músculo libres de grasa externa, picadas cuidadosamente y alicuotadas en porciones de 5 gr. La determinación del PGI se realizó por duplicado, según el método de Soxhlet (AOAC, 2000) mediante destilación continua con hexano a ebullición a partir de porciones previamente desecadas (4 horas a 100°C), utilizando un equipo Soxtec System HT 1043 Extraction Unit (Tekator, Suecia) para la extracción de grasa, y una estufa ORL – Hornos eléctricos (Argentina). La extracción de lípidos para la determinación del perfil de ácidos grasos se realizó por el método de Folch y colaboradores (1957) modificado, según se detalla a continuación: a 5 gr de muestra picada se le agregaron 5 ml de cloroformo y 10 ml de metanol anhidro, y se homogeneizaron durante 3 minutos en un homogeneizador Omni mixer (Omni International, EEUU); se agregaron otros 5 ml de cloroformo, y se

homogeneizó durante otro minuto. Se agregaron 2,5 ml de agua destilada y se volvió a homogeneizar la muestra durante 1 minuto. Posteriormente, se filtró con vacío a través de papel de filtro de filtración rápida de la marca Quanty tipo: JP41 (Brasil) y usando un embudo Buchner de 6 cm de diámetro. Se lavó cuidadosamente con pequeñas alícuotas de cloroformo todo el material utilizado a los fines de recuperar todos los lípidos provenientes de la muestra. Posteriormente, se centrifugó el filtrado para separar las fases, y se eliminó por aspiración la fase acuosa (superior) en la cual se encontraban todos los componentes no lipídicos. La fase inferior se volvió a filtrar para eliminar impurezas sólidas y fase acuosa remanentes, y se conservó a -20°C hasta su análisis. Los FAMES se obtuvieron evaporando a sequedad en atmósfera de nitrógeno una alícuota de 2 ml del extracto obtenido, y agregando 2 ml de reactivo de metilación (Metanol + 4% HCl), tapándolo cuidadosamente con cinta de teflón y un tapón para evitar evaporaciones. Se calentó durante 2 horas a 70°C, o hasta que no se observaran rastros de grasa en el tubo. Posteriormente, se agregaron 2 ml de agua destilada y 2 ml de hexano, se agitó y centrifugó. La capa de hexano (superior) se pasó a un tubo limpio y se repitió la extracción y centrifugación con otros 2 ml de hexano. Finalmente, la determinación se realizó inyectando 1 µl de solución en un cromatógrafo de gases Varian CP 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, California, EEUU), provisto de una columna capilar de sílice Varian WCOT Fused Silica de 100m x 0,25 mm Coting CP-Sil 88 for FAME DF=2.0, utilizando como gas portador nitrógeno ultra puro. El cromatógrafo se programó a 70°C por 4 minutos, incrementando hasta 170°C a razón de 8°C por minuto, manteniéndola por 25 minutos, elevándola hasta 200°C a razón de 2,5 °C por minuto, manteniéndola por 15 minutos, luego llevándola a 220°C a razón de 5°C por minuto y finalmente manteniéndola por 5 minutos. Tanto el detector de ionización de llama (FID) como el inyector se mantuvieron a una temperatura de 250°C. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con estándares conocidos (PUFA N°2 Animal Source, Supelco, EEUU). La composición se expresó en forma porcentual respecto del total de ácidos grasos identificados, los cuales se pueden referir al extracto etéreo total, es decir, gramo de ácido graso por cada gramo de grasa total.

2.2.2.5 Mediciones asociadas a los micronutrientes de la carne

Adicionalmente, para este grupo de muestras se realizó la determinación de la composición de micronutrientes totales (metales en general) y en particular del hierro total, por medio de la obtención de cenizas. Se tomaron muestras de la carne congelada, de aproximadamente 10 gr, que fueron deshidratadas en liofilizador por 24 horas, y luego por diferencia de masas se estimó el porcentaje de agua (PA) contenido. Las muestras de carne liofilizadas fueron llevadas a la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), donde se procesaron en un molinillo y se realizó una primera carbonización en mechero bajo campana hasta que no se observara emisión de humo, para eliminar la parte mayoritaria de los compuestos orgánicos. Luego los remanentes carbonizados se pasaron a una mufla a 500°C, realizando lavados con unas pocas gotas de agua destilada hasta que las cenizas se observaran completamente blancas. Por diferencia de masas se determinó la masa total de cenizas para determinar el porcentaje de micronutrientes (PC) en cada muestra. Las cenizas fueron resuspendidas en HNO₃ concentrado (65% p/p, 1,40 gr/ml), y conservadas en tubos plásticos (previamente lavados por triplicado con HNO₃ al 20%). Finalmente, la determinación de la concentración de hierro total se realizó en el Instituto de Desarrollo e Investigaciones Pediátricas "Prof. Dr. Fernando E. Viteri" (IDIP) del Hospital de Niños "Sor María Ludovica" de La Plata, por espectrometría de absorción atómica en llama en un equipo Varian AA240FS (Agilent, Santa Clara, California, EEUU). Previamente, se había construido una curva de calibración con patrones *Iron Standard Solution* trazable de NIST Certipur (Merck, Darmstadt, Alemania). Los resultados se expresaron en unidades de ppm en la masa original de muestra.

2.2.2.6 Mediciones asociadas al poder oxidativo total de la carne

Para obtener una idea del estado redox de las muestras de carne, se estimó el poder oxidativo total en extractos de carne a través de dos ensayos: a) midiendo la capacidad de

oxidar NADH, utilizando un kit para determinación de actividad de LDH-P (Wiener lab, Rosario, Argentina), y b) midiendo el nivel de peroxidación lipídica, a través del ensayo modificado de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Armstrong y Browne, 1994). En ambos casos las determinaciones se realizaron en extractos crudos de músculo obtenidos procesando aproximadamente 1 gr de tejido en un homogeneizador FastPrep 5G con Matriz de Lisis A (MP Biomedicals, Santa Ana, California, EEUU) y búfer PBS 1X (Ver Anexo). Para la homogeneización se utilizó el protocolo disponible en el equipo para músculo de pata de ratón (6,0 m/seg, durante 40 segundos), que luego se centrifugó a 14.000 g durante 2 minutos; la fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo y se conservó en freezer hasta la determinación.

Para el ensayo de oxidación de NADH, se colocaron 50 µl de muestra (o de una dilución según fuera necesario en cada caso) en una placa de fondo plano, a las que luego se le agregaron con pipeta multicanal 100 µl de reactivos reconstituidos según las indicaciones del fabricante, e inmediatamente se comenzó a medir el descenso de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, EEUU). La actividad oxidante de NADH (PR) se calculó a partir de la pendiente del segmento inicial lineal de las curvas de absorbancia en función del tiempo, y se expresó como el cambio en la absorbancia por segundo y por gramo de masa de carne utilizada para preparar el extracto crudo de cada muestra.

En el caso del ensayo de TBARS, la peroxidación de los lípidos de la carne genera diversos productos entre los que se encuentra el malondialdehído (MDA), un aldehído de bajo peso molecular. Esta molécula reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) generando una especie cuya concentración puede medirse espectrofotométricamente (Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998). Para la determinación, en tubos de 200 µl se colocaron 50 µl de muestra junto con 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) 5% y 50 µl de TBA 0,67%. Para llevar a cabo la reacción, la mezcla se calentó a 100°C durante 20 minutos, luego se centrifugó a 14.000 g por 2 minutos y se colocaron 80 µl del sobrenadante en placas de fondo plano para medir la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO

(Thermo Fisher Scientific, EEUU). Para este ensayo se armó una curva de calibración de MDA como se indica en el Anexo. Los resultados se expresaron como nanomoles de MDA por gramo de carne utilizada para preparar el extracto crudo de cada muestra.

2.3 Extracción y Cuantificación de ADN

2.3.1 Extracción de ADN de muestras de pelo

Siguiendo el protocolo de NaOH/HCl de Graffy y Foran (2005), se cortaron cinco a diez bulbos pilosos y se colocaron en un tubo de microcentrífuga, luego se agregaron 50 µl de NaOH 0,2 M y se calentó a 95°C durante 15 min. Inmediatamente después, la solución sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo y se neutralizó con 50 µl de una solución de HCl 0,2 M - TRIS 1 M.

2.3.2 Extracción de ADN de muestras de sangre con el kit Wizard®

El ADN total de muestras de sangre se extrajo con el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, WI, EEUU), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

2.3.3 Extracción de ADN de muestras de sangre por el método orgánico

A partir de 500 µl de sangre se obtuvieron los glóbulos blancos por sucesivos lavados (hasta tres) con 1000 µl de agua y una posterior centrifugación a 10.000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Una vez que el precipitado obtenido se observara de color blanco, se le agregaron 400 µl de buffer de extracción (0,01 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, 0,5% SDS, pH 8) y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Luego se incubó el tubo a 55 °C durante 3 horas para la digestión de las células. A continuación, se agregaron 400 µl de cloroformo, se mezclaron

las fases hasta emulsionarlas y se centrifugó el tubo a temperatura ambiente durante 1 min a 10.000 g. La fase superior (acuosa) se pasó a otro tubo, descartando la fase orgánica inferior y la intermedia de compuestos anfifílicos. Este proceso se repitió 2 veces más. La fase superior se pasó a un nuevo tubo y se le agregó acetato de amonio 10 M (concentración final 2,5 M) para precipitar las posibles proteínas remanentes, luego se centrifugó a temperatura ambiente a 14.000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 800 µl de etanol 100% y se incubó durante una hora a -20°C. El ADN se precipitó centrifugando a temperatura ambiente 15 min a 14.000 g. El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70%, se centrifugó nuevamente a temperatura ambiente 5 min a 14.000 g y se descartó la fase líquida. Se secó el ADN a temperatura ambiente y se solubilizó en 200 µl de agua bidestilada a 37 °C durante toda la noche.

2.3.4 Extracción de ADN de muestras de carne

Siguiendo el protocolo reportado por Giovambattista y colaboradores (2001), se tomaron 0,1 gr de carne congelada a -80°C y se cortaron en pequeños trozos con un escarpelo. Se colocaron en un tubo junto a 500 µl de buffer de digestión (0,01 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, 0,5% SDS, pH 8), 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 30 µl de Ditioneitol (DTT 0,5 M). La suspensión se incubó a 55°C durante toda la noche para la digestión completa del tejido. Luego se realizó una extracción orgánica con 500 µl de cloroformo, mezclando las fases por inversión y centrifugando a temperatura ambiente durante 5 minutos a 14.000 g. La fase superior (acuosa) se pasó a otro tubo, descartando la fase orgánica y la intermedia de compuestos anfifílicos. Este proceso se repitió una vez más. La fase superior se pasó a un nuevo tubo y se le agregó acetato de amonio 10 M (hasta una concentración final 2,5 M) para precipitar las posibles proteínas remanentes, se centrifugó a temperatura ambiente a 14.000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante, se completó el tubo con etanol 100% y se incubó durante una hora a -20°C. El ADN se precipitó centrifugando a temperatura ambiente 15 min a 14.000 g. El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70%, se centrifugó nuevamente a

temperatura ambiente 5 min a 14.000 g y se descartó la fase líquida. Se secó el ADN a temperatura ambiente y se solubilizó en 200 µl de agua bidestilada a 37 °C durante toda la noche.

2.3.5 Cuantificación de ADN

La concentración y pureza del ADN obtenido se evaluó en un espectrofotómetro NanoView (GE Healthcare, EEUU), se prepararon soluciones de trabajo de concentración en torno a los 50 ng/µl y se conservaron en un freezer a -20°C hasta su utilización. Además, la integridad del ADN extraído se controló corriendo alícuotas de las muestras en geles de agarosa 1% - 0,5X TBE.

2.4 Selección de Genes Candidatos, Secuenciación y Genotipificación

2.4.1 Selección de genes candidatos

Los genes candidatos estudiados se seleccionaron en base a distintos criterios, aunque siempre teniendo en cuenta su posible participación en la determinación del color de la carne. En primer lugar, el gen de la Mb se seleccionó ya que codifica para la mioglobina, que es el principal pigmento del músculo, siendo el color observado de la carne ampliamente influido por el equilibrio entre los diferentes estados de oxido-reducción y la unión de diferentes ligandos a esta proteína. Por su parte, la influencia del sistema lactato-LDH en el color de la carne ya fue estudiada en diversos trabajos (Kim y col., 2009; Ramanathan y col., 2014). Particularmente en músculo esquelético se encuentra el homotetrámero LDHA que favorece la formación de lactato a partir de piruvato con consumo de NADH (Kim y col., 2006). El polipéptido codificado por el gen LDHA forma parte de las diferentes isoenzimas de la LDH, que influyen en el equilibrio entre piruvato y lactato, y afectan la disponibilidad de NADH *post mortem*, ya sea consumiéndolo o regenerándolo.

Este cofactor es el principal agente utilizado en la reducción, tanto enzimática como no enzimática, de la MetMb responsable de la coloración marrón en la carne (Belskie y col., 2015; Ramanathan y col., 2014).

Otro factor que se tuvo en cuenta fue la participación del estado redox celular en la carne, ya que esto influye en el equilibrio de los estados redox de la Mb y en la estabilidad del resto de los componentes celulares, por ejemplo los lípidos, cuyos productos de oxidación podrían influir en el color de la carne (Faustman y col., 2010; Vasieva, 2011). En este sentido los genes GSTP1, GPX4 y CCS participan en la regulación del estado redox, degradando y metabolizando productos oxidantes del metabolismo, como son los radicales libres y el H_2O_2 . Como se mencionó en el Capítulo 1, las enzimas GSTP1 y GPX4 participan, entre otras funciones, en la degradación de compuestos oxidantes utilizando el sustrato GSH, que actúa como moneda redox celular. Por un lado, GSTP1 participa en procesos de detoxificación celular y resistencia al estrés oxidativo (Lo Bello y col., 2001), consumiendo agentes oxidantes en general, favoreciendo por lo tanto la estabilidad de los pigmentos *post mortem*. Por su parte, GPX4 presenta afinidad por los hidroperóxidos, específicamente hidroperóxidos de fosfolípidos generados por la degradación de membranas (Deponte, 2013), protegiendo la integridad celular y favoreciendo nuevamente la estabilidad de los pigmentos. En el caso particular de CCS, la enzima codificada no participa directamente en la degradación de agentes oxidantes, sino que se encarga de la activación de la Superóxido Dismutasa (SOD) que degrada el H_2O_2 . Específicamente, esta enzima cumple la función de captar y transportar el átomo de cobre necesario para la actividad de la SOD.

Además de su importancia en la definición del color de la carne por la función que cumplen en la regulación del estado redox celular, los genes GSTP1, LDHA y CCS se encuentran ubicados en el cromosoma 29 del genoma bovino (BTA29). En este mismo cromosoma se encuentra el gen codificante para la Calpaína (CAPN1), una enzima que participa del sistema encargado de la proteólisis en las células, de gran importancia para la calidad de la carne (Van Ba y Inho, 2013; Moyen y col., 2004; White y col., 2005). Existen referencias que han asociado marcadores presentes en este gen, que se encuentra a tan

solo 2 Mb y 1 Mb de distancia *upstream* de GSTP1 y CCS, respectivamente, con parámetros colorimétricos de la carne (Mazzucco y col., 2010; Pinto y col., 2011), lo cual refuerza la selección de estos genes como candidatos para la búsqueda de marcadores asociados al color. En este mismo sentido, el gen codificante para GPX4 se encuentra en el BTA7 junto con la calpastatina (CAST), una enzima que participa en la regulación del sistema proteolítico de CAPN1, y que también presenta marcadores que han sido asociados a parámetros colorimétricos (Castro y col., 2016), aunque su distancia a GPX4 es mayor, encontrándose a más de 50 Mb.

2.4.2 Genotipificación para estudio de asociación

Para llevar a cabo el estudio de asociación entre parámetros de color de carne y marcadores genéticos, se seleccionaron 11 SNPs ubicados en los cinco genes candidatos, que por su función biológica podrían estar influenciando el color de la carne: Chaperona del Cobre para la Superóxido Dismutasa (CCS), CCS-1 (rs134083963) y CCS-2 (rs110015162); Lactato Deshidrogenasa A (LDHA), LDHA-1 (rs41600268) y LDHA-2 (rs208422143); Mioglobina (MB), MB-1 (rs110676666) y MB-2 (rs136397633); Glutación S-Transferasa P1 (GSTP1), GSTP1-1 (rs110594162), GSTP1-2 (rs109060695) y GSTP1-3 (rs42188145); y Glutación Peroxidasa 4 (GPX4), GPX4-1 (rs134495045) y GPX4-2 (rs133501979) (para más información de cada SNP ver **Tabla 2**). Los SNPs se seleccionaron de la base de datos dbSNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)⁶ de acuerdo a los siguientes criterios: i) el SNP debe estar localizado dentro del gen o en las regiones cercanas a 5'UTR o 3'UTR, ii) el SNP debe estar reportado en las razas Angus y/o Hereford. La genotipificación de estos SNPs se llevó a cabo con la plataforma Sequenom (www.sequenom.com), en el servicio de genotipificación de Neogen (EEUU, www.neogen.com).

⁶ Actualmente esta base de datos únicamente almacena variantes de humanos. La misma información aún puede encontrarse en las bases de datos de Ensembl (www.ensembl.org).

Tabla 2. SNPs genotipificados para el estudio de asociación exploratorio.

Gen	SNP	Referencia	Cromosoma	Posición	Ubicación dentro del gen	Alelos	Sustitución aminoacídica
MB	MB-1	rs110676666	5	74181329	UTR-5'	C-T	-
MB	MB-2	rs136397633	5	74181475	UTR-5'	G-T	-
GPX4	GPX4-1	rs134495045	7	45207158	exón 6	G-T	Asp-Tyr
GPX4	GPX4-2	rs133501979	7	45207145	exón 6	G-T	Trp-Cys
LDHA	LDHA-1	rs41600268	29	26544450	UTR-3'	A-G	-
LDHA	LDHA-2	rs208422143	29	26554268	UTR-5'	C-T	-
CCS	CCS-1	rs134083963	29	45274451	UTR-5'	C-T	-
CCS	CCS-2	rs110015162	29	45287502	exón 8	C-T	Gln-Gln
GSTP1	GSTP1-1	rs110594162	29	46089472	exón 6	A-G	Ala-Ala
GSTP1	GSTP1-2	rs109060695	29	46089840	exón 7	C-G	Ala-Gly
GSTP1	GSTP1-3	rs42188145	29	46089886	exón 7	C-G	Pro-Pro

Posiciones según el ensamblado de genoma: Bos_taurus_UMD_3.1.1 ([GCF_000003055.6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003055.6)).

2.4.3 Re-secuenciación de genes candidatos

Todas las mezclas de reacción se armaron utilizando el kit de amplificación T-Holmes (Inbio Highway, Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MaxyGene (Axygen, Corston, Reino Unido). Los protocolos de amplificación y la composición de las mezclas de reacción utilizadas se muestran en el Anexo.

La re-secuenciación de los genes candidatos se realizó con muestras de animales de diferentes razas para contar con una gran diversidad genética. Como se mencionó en la Sección 2.1, para el gen GSTP1 se utilizaron individuos de las razas Angus, Brahman, Criollo, Hereford, Holando, Nelore y Wagyu, mientras que en el caso de LDHA se utilizaron las razas Angus, Brahman, Hereford, Holando y cruza Wagyu x Angus y Wagyu x Holando. En el caso de GSTP1 se re-secuenció el gen completo, incluyendo exones, intrones y una

región del promotor, mientras que para LDHA el diseño de los *primers* se centró en las regiones codificantes y el promotor, debido al gran tamaño de algunos de sus intrones. El diseño de los *primers* se realizó en base a las secuencias de referencia disponibles en NCBI (Gen IDs: GSTP1: 281806; LDHA: 281274; **Tabla 3**). Los productos de amplificación obtenidos se verificaron sembrando 3 µl de muestra junto con 1 µl de buffer de siembra (TBE 1X, glicerol 50%, xilencianol 0,1 %p/v y azul de bromofenol 0,1 %p/v) en geles de poliacrilamida al 6% 1X TBE y corridos a 170 voltios durante 30-40 minutos. Los geles se revelaron mediante tinción con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador UV, para comprobar la presencia de una única banda del tamaño esperado por comparación con un marcador de peso molecular. Posteriormente, los productos de amplificación obtenidos se purificaron mediante la técnica de precipitación diferencial con polietilenglicol 8000 (ver Anexo) y se secuenciaron en el Servicio de Genética de Animales Domésticos (GAD) del IGEVET (<http://www.igevet.gob.ar/servicios.html>).

2.4.4 Análisis de secuencias

Las secuencias crudas obtenidas para los genes candidatos se alinearon y analizaron con el software DNAMAN v4.15 (Lynnon Corp., Canadá). Las posiciones polimórficas se definieron por comparación directa con la secuencia de referencia depositada en el NCBI. En el caso de los sitios heterocigotas se realizó el control individual de las secuencias de ADN con el software Chromas Lite v2.1.1 (Technelysium, Australia; <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

Tabla 3. *Primers* diseñados para amplificar los genes GSTP1 y LDHA.

Gen	Primer	Secuencia	Amplificado (pb)	T _m (°C)	Posición Genómica	Región Cubierta
GSTP1	GSTP1 E1-2 F	TGTCGTGGAACAAGTGTCCAC	815	57,0	46086841	Promotor, 5'UTR, y exones 1 y 2
	GSTP1 E1-2 R	ACTGCTCGGAAGACCTCACAGC		60,8	46087655	
	GSTP1 E3-4 F	TACTTCCCGGTTCAAGGTAGGGAC	576	63,4	46087434	Exones 3 y 4
	GSTP1 E3-4 R	ATTGGACTGGTACAGCGTGAGGT		63,8	46088008	
	GSTP1 E4 F	CAAGGCCCTCCTGCGTGAGTA	475	61,9	46087817	Exón 4
	GSTP1 E4 R	GAGTGGGTAGCCTATCCCTTCG		61,7	46088290	
	GSTP1 I4E5 F	TGTGGAGGTTATCTAGGGCTTGC	558	62,0	46088167	Exón 5
	GSTP1 I4E5 R	CCTTCTTTCTTTGTCTCCTCCGTG		59,8	46088724	
	GSTP1 E5I5 F	CCCTGGTGGACATGTTGAA	541	59,2	46088605	Exón 5
	GSTP1 E5I5 R	TCCCTCCAGCTCCATTTCATC		58,9	46089145	
LDHA	GSTP1 I5E6 F	TTGGGAGCAGTTTCGCAGA	704	59,5	46089064	Exón 6
	GSTP1 I5E6 R	CCAGCAGGTTGTAGTCGCA		62,4	46089767	
	GSTP1 E6-7 F	GAGTGGCCATCCTCTCATCC	757	59,6	46089367	Exón 7
	GSTP1 E7 R	CACGACTGAAGCAACGTAGCA		61,2	46090123	

Tabla 3 (continuación). *Primers* diseñados para amplificar los genes GSTP1 y LDHA.

Gen	Primer	Secuencia	Amplificado (pb)	T _m (°C)	Posición Genómica	Región Cubierta
LDHA	LDHA Prom F	CTGGAGGCCATTGACTGAGG	715	60,1	26556244	Promotor, 5'UTR y Exón 1
	LDHA Prom R	CCCACCAATTCCACAAAGGC		59,7	26555530	
	LDHA E2 F	CAGGGCATGTTTTCCCTTATAGG	953	59,7	26551070	Exón 2
	LDHA E2 R	GTGGTTCAGTGGTTGGGAGA		60,1	26550118	
	LDHA E3 F	AATGAGAAAGGAGCTGAAGGCA	982	59,0	26550271	Exón 3
	LDHA E3 R	AAATCAACCTTGGCAGAGACA		58,4	26549290	
	LHDA E4-5 F	TTGCTGGAGTTTCTTAAAAAGCC	969	58,1	26548410	Exones 3 y 4
	LDHA E4-5 R	TCCAGATTGCAACCACCTTCCA		59,9	26547442	
	LDHA E5-6 F	TCTCCACAGTCGATATTTTGACCTA	964	59,3	26547529	Exones 5 y 6
	LDHA E5-6 R	CAAACTATGAGATCTATTACCTGTC		54,8	26546566	
	LDHA E7-8 F	CCTTCGCTATCCTACAGTGCT	942	59,3	26545355	Exones 7 y 8
	LDHA E7-8 R	CCTCCAACATAAATCCTGTGTAGCC		61,4	26544414	

2.5 Análisis estadísticos

2.5.1 Análisis de variabilidad genética

Para el estudio de la variabilidad genética se utilizaron los softwares GenePop 4.0 (Rousset, 2008) y Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), con los cuales se determinaron las frecuencias alélicas, la heterocigosidad esperada (h_e) y observada (h_o) para cada locus, y se testeó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada SNP por medio del estadístico F_{IS} . El desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de cada gen y entre los distintos genes se determinó usando el software Haploview (Barrett y col., 2005), y la reconstrucción de los haplotipos se realizó con el programa Phase v2.1.1 (Li y Stephens, 2003) utilizando la configuración por default. Las fases fueron consideradas confiables cuando el valor de p (p -value) era mayor a 0,8.

A partir de los haplotipos generados con los SNPs obtenidos por re-secuenciación de los genes candidatos se generaron las secuencias predichas de ARN mensajeros (p-ARNm) y de proteínas (p-Prot), que se utilizaron para los posteriores análisis *in silico*.

2.5.2 Estudio de asociación

El análisis de la asociación entre marcadores genéticos y parámetros de color de la carne se llevó a cabo utilizando los datos del G-I de muestreo bajo el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mathbf{GF}_j + \mathbf{Ge}_k + \mathbf{EA}_i + \mathbf{pH}_i + \mathbf{EET}_i + \mathbf{AGPI}_i + \mathbf{e}_{ijk}$$

en donde y_{ijk} se refiere a cada característica estudiada (L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* , h_{ab}) y considera los efectos \mathbf{GF}_j , efecto fijo del grupo de faena j (que incluye el año, tipo de alimentación y fecha de faena); \mathbf{Ge}_k , efecto genotípico asociado al genotipo k ; y las covariables \mathbf{pH}_i , pH de la carne del individuo i a las 0 hs; \mathbf{EA}_i , edad del animal i al momento de la faena; \mathbf{EET}_i , la

composición lipídica total de i expresada como extracto etéreo total; y $AGPI_i$, la proporción de ácidos grasos poli-insaturados de i , mientras que e_{ijk} es el error del modelo. La influencia de razas de los animales no se consideró en el modelo para evitar sobreparametrizaciones que reducen la potencia del análisis, ya que fue testeada y no resultó significativa para los parámetros estudiados. Todos los análisis se realizaron usando el procedimiento GLM, del paquete estadístico SAS 9.2 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Adicionalmente, todos los análisis fueron realizados de manera independiente utilizando la corrección de Bonferroni, y dado que se analizaron 5 parámetros, se calcularon los p -value ajustados, multiplicando los p -value obtenidos por el número de parámetros (5).

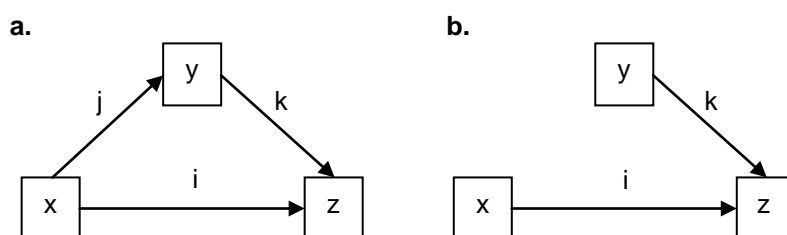
2.5.3 Modelos de ecuaciones estructurales

El modelado de sistemas de ecuaciones estructurales (SEM, por *Structural Equations Modeling*) hace referencia a una familia de procedimientos, incluyendo modelos matemáticos, algoritmos computacionales y métodos estadísticos, utilizados para analizar e inferir causalidades entre variables medibles y/o latentes, en función a una hipótesis (el modelo estructural) especificada *a priori* (Kline, 2015; Mueller y col., 2018). Esta no debe ser vista como una técnica estadística, sino como un proceso de análisis que implica la conceptualización de un modelo, la identificación y estimación de parámetros, la evaluación del ajuste entre datos y modelo, y la posible necesidad de re-especificación del modelo inicial. En este sentido, SEM puede aplicarse de tres maneras: estrictamente confirmatorio (se cuenta con un único modelo que es retenido o descartado según si los datos se ajustan al mismo), testeo de modelos alternativos (existe más de un modelo *a priori* con las mismas variables pero distintos patrones de efecto entre ellas, reteniendo aquel que mejor se ajuste), y generación de modelos (ocurre cuando un primer modelo no se ajusta a los datos y debe ser modificado; el nuevo modelo es re-evaluado frente a los datos). Es importante destacar que esta metodología es fuertemente dependiente del conocimiento previo del funcionamiento del sistema a estudiar, de manera de asegurarse que las variables

analizadas estén relacionadas bajo un modelo causal, y además debe ser complementado con información temporal de las variables, dado que eventos que ocurren posteriormente no pueden tener un efecto sobre eventos previos (Shipley, 2016).

Esta herramienta se utilizó para analizar los datos fenotípicos del grupo G-II, y poder evaluar la influencia de variables relacionadas al estrés oxidativo de la carne (como la peroxidación lipídica y el consumo de NADH), variables de calidad (como EET, AGPI, PGI) y otras (como pH y temperatura post faena, composición de agua -PA- y de cenizas -PC-), sobre los parámetros colorimétricos CIELAB (L^* , a^* , b^*). Para esto se utilizó la metodología de *path analysis*, que consiste en la especificación de ecuaciones estructurales con variables observables o medibles únicamente. Todos los estudios se realizaron con el paquete de R `lavaan` (Rosseel, 2012; <https://www.r-project.org/>) y visualizado en el programa RStudio 3.5.1 (<https://www.rstudio.com/>).

Para realizar el análisis se comenzó por construir modelos compuestos por 3 variables fenotípicas (de manera general, “x”, “y”, “z”), que fueron testeados bajo dos modelos de interacción entre las mismas, de efectos directos e indirectos, como se muestra en los siguientes esquemas:



En el esquema **a** se observan tanto los efectos directos de “x” e “y” sobre “z”, como el efecto indirecto de “x” sobre “z” a través de “y”, mientras que en **b** sólo se tienen los efectos directos de cada variable sobre “z”. Es importante destacar que con este método no es posible determinar la direccionalidad de las relaciones entre las variables, por lo que el valor de los estimadores (“i”, “j”, “k”) es el mismo para los efectos en un sentido y en otro (es decir, tanto la relación $x \rightarrow y$ como $y \rightarrow x$ dará el mismo resultado). De esta manera, se realizaron

todas las comparaciones posibles entre las variables, y de aquellas que resultaron significativas ($p\text{-value} < 0,05$), se analizaron solamente las que tuvieran un sentido biológico.

2.6 Estudios *in silico*

2.6.1 Análisis funcional de sustituciones aminoacídicas en GSTP1

Para analizar el potencial efecto que podrían tener las sustituciones no sinónimas de residuos aminoacídicos (nsSNPs) sobre la estructura, función y estabilidad de la proteína codificada por GSTP1, se utilizaron diversas herramientas de libre acceso que realizan enfoques basados en la secuencia y la estructura de la proteína nativa. Como referencia se utilizó la secuencia consenso de la proteína disponible en NCBI (NP_803482.1), contra la cual se realizó la comparación de las proteínas mutadas. Las herramientas utilizadas fueron: SIFT - *Sorting Intolerant from Tolerant* (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html) (Ng y Henikoff, 2001): se utilizó para predecir el potencial deletéreo de una sustitución aminoacídica en función a la conservación de cada residuo desde un punto de vista evolutivo. A partir de la secuencia problema, SIFT realiza una búsqueda de secuencias de elevada similitud para realizar un alineamiento múltiple, a partir del cual calcula la probabilidad normalizada para todas las posibles sustituciones de cada posición de dicho alineamiento. Los puntajes de salida se clasificaron como dañinos (0 - 0,05), potencialmente dañinos (0,05 - 0,10) y neutrales (> 0,10).

PROVEAN - *Protein Variation Effect Analyzer* (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) (Choi y col., 2012): se utilizó para predecir el posible efecto deletéreo de una sustitución aminoacídica sobre la estructura y función de la proteína. De manera resumida, PROVEAN calcula un puntaje en función al promedio pesado de los cambios que genera una sustitución aminoacídica en los puntajes de alineamiento de a pares entre la secuencia

problema y un set de secuencias homólogas⁷. Las variantes se consideraron deletéreas si el puntaje de salida era menor a -2,5 y neutral si se encontraba por encima de ese valor de corte.

PolyPhen 2 - *Polymorphism Phenotyping v2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei y col., 2010): se utilizó para predecir el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína mediante una comparación directa de consideraciones físicas y evolutivas. Además de realizar un alineamiento de secuencias homólogas como en los programas anteriores, PolyPhen 2 incorpora una serie de características y anotaciones tomadas de distintas bases de datos para analizar con mayor profundidad el potencial efecto de las sustituciones. Finalmente, toda esta información es evaluada por un clasificador entrenado por métodos de aprendizaje computacional (*machine learning*). Las mutaciones se clasificaron como probablemente dañinas ($\geq 0,85$), posiblemente dañinas (0,15 - 0,85) y benignas (0 - 0,15).

PANTHER-PSEP - *Position-Specific Evolutionary Preservation - cSNP Scoring* (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>) (Tang y Thomas, 2016): se utilizó para profundizar el análisis del efecto de mutaciones en la función de una proteína desde un punto de vista evolutivo. Este método se basa en la generación de árboles filogenéticos, alineamientos y la reconstrucción de secuencias ancestrales, para evaluar la preservación de un residuo específico a lo largo del tiempo. Las mutaciones se clasificaron como probablemente dañinas cuando el tiempo de preservación de un residuo era mayor a los 450 millones de años, posiblemente dañino cuando estaba entre los 200 y 450 millones de años, y probablemente benigno si era menor a los 200 millones de años.

MutPred 2 (<http://mutpred.mutdb.org/>) (Pejaver y col., 2017): se utilizó para calcular la probabilidad que tiene una sustitución aminoacídica de ser patogénica (cuando el puntaje fuera mayor a 0,8) o no patogénica (para puntajes menores a 0,8), utilizando una

⁷ Contrario a lo que ocurre con SIFT en donde se hace una evaluación posición específica, en el caso de PROVEAN se tiene en cuenta el efecto que genera la sustitución en el alineamiento de las posiciones vecinas.

metodología de *machine learning* que integra información genética y molecular, en función a un entrenamiento previo con sets de datos conocidos.

I-Mutant Suite 3.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>) (Capriotti y col., 2005): se utilizó para predecir los cambios en la estabilidad de la proteína como consecuencia de una sustitución aminoacídica, en función al cambio generado en la energía libre de Gibbs de desnaturalización ($\Delta\Delta G$) entre la estructura de la proteína nativa y de la proteína mutante. Las mutaciones se clasificaron como principalmente desestabilizantes de la estructura proteica ($\Delta\Delta G < -0,5$ Kcal/mol), principalmente estabilizantes ($\Delta\Delta G > 0,5$ Kcal/mol) o con efecto débil en la estabilidad de la estructura ($-0,5 < \Delta\Delta G < 0,5$ Kcal/mol). Para determinar el sentido del cambio y estimar su valor, este programa también utiliza métodos de aprendizaje automático para clasificar y analizar por regresión los datos, en función a un entrenamiento previo con sets de datos conocidos. A diferencia de todos los otros métodos, en este caso se utilizó para el análisis la secuencia de la proteína reportada en NCBI modelada tridimensionalmente con el servidor I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*, <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang y col., 2015).

HOPE - *Have (y)Our Protein Explained* (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>) (Venselaar y col., 2010): se utilizó para generar una predicción y análisis integral del efecto de cada una de las mutaciones detectadas sobre la estructura tridimensional y la función de las proteínas. Este servidor realiza un alineamiento por BLAST contra diversas bases de datos como UniProt y PDB para recopilar información estructural de la proteína nativa y generar el análisis del efecto de la mutación.

2.6.2 Modelado estructural de GSTP1 y visualización

Se realizó el modelado tridimensional de las proteínas codificadas por el gen candidato GSTP1 para comparar las estructuras de las proteínas nativa y mutantes. Dado que no se encuentra reportada en la base de datos PDB ninguna estructura correspondiente

a la GSTP1 bovina, se utilizó el servidor I-TASSER para modelar la secuencia primaria de referencia de esta proteína según se encuentra en la base de datos NCBI (NP_803482.1). De la misma manera, se modelaron las estructuras tridimensionales de las p-Prot traducidas a partir de los haplotipos obtenidos luego de la etapa de re-secuenciación. A continuación, se utilizó el software Swiss PdbViewer v4.1.0 (<http://www.expasy.org/spdbv/>) (Guex y Peitsch, 1997) para analizar las estructuras obtenidas y generar imágenes ilustrativas. Adicionalmente, este software se utilizó para estimar el volumen y la superficie total de las proteínas, y de la cavidad que contiene su sitio activo. La desviación que presentan los haplotipos respecto de la estructura obtenida a partir de la secuencia consenso se evaluó utilizando la desviación cuadrática media (RMSD) entre las cadenas de carbonos alfa de las estructuras. Esta es una medida de cuánto se desvía una estructura respecto a otra estructura de referencia, comparando pares de átomos equivalentes entre ambas (en este caso los átomos de carbono alfa de cada residuo aminoacídico que conforman el esqueleto carbonado de la proteína).

2.6.3 Estudios basados en Dinámica Molecular

Para analizar la estabilidad y el comportamiento de las estructuras tridimensionales modeladas de los haplotipos de GSTP1 en condiciones fisiológicas, se realizaron estudios a nivel atómico usando Dinámica Molecular (DM) como técnica central y el paquete de software libre de GROMACS (<http://www.gromacs.org/>) (Abraham y col., 2015; Berendsen y col., 1995).

Las simulaciones por DM se basan en la resolución de las ecuaciones de Newton de movimiento (es decir, utilizan la mecánica clásica) para un sistema de partículas que interaccionan entre sí, calculando en pequeños intervalos de tiempo (normalmente se utilizan pasos de integración entre 1 y 2 fs⁸) la fuerza que es ejercida sobre cada partícula, para ir actualizando la posición, velocidad y aceleración de cada uno de los átomos del

⁸ 1 femtosegundo = 10⁻¹⁵ segundos

sistema (Hospital y col., 2015). De esta manera, el sistema evoluciona durante un tiempo predeterminado, tendiendo en general hacia un estado de equilibrio si la dinámica está modelada correctamente. Para poder llevar a cabo la simulación del sistema, en DM se utiliza el concepto de campo de fuerza⁹, el cual contiene toda la información necesaria para describir la interacción entre los átomos de un sistema de manera adecuada. Los campos a utilizar se eligen de acuerdo al sistema a modelar y la validación obtenida mediante resultados previos contrastados con resultados experimentales. Además, para el caso de DM de moléculas se deben aplicar restricciones topológicas al sistema correspondientes a los enlaces covalentes y sus respectivos ángulos. Finalmente, registrando a intervalos regulares las coordenadas de cada átomo, junto con su dirección y velocidad de movimiento, en función del tiempo se obtiene la trayectoria del sistema.

Cada uno de los archivos de estructura obtenido de I-TASSER para cada p-Prot se utilizó como configuración inicial para las simulaciones bajo DM. Dado que estos archivos sólo contienen la información de las coordenadas de los átomos, se debe emplear la función `pdb2gmx` para incorporar la información de la topología de la molécula y definir también el campo de fuerza, en este caso Amber99 (Wang y col., 2000). A continuación se procedió a solvatar el sistema utilizando el modelo de agua explícito SPC/E (modelo rígido de tres puntos) (Berendsen y col., 1987), e incorporar iones Na^+ y Cl^- a concentración salina para obtener una caja de simulación con condiciones similares al ambiente celular. En el proceso de preparación y estabilización del sistema, para eliminar situaciones de contacto energéticamente desfavorables entre las distintas especies, se realizó un proceso de minimización de la energía utilizando el método de *Steepest descent* hasta alcanzar un gradiente de energía potencial ≤ 1000 kJ/mol, mientras se mantuvo restringido el esqueleto de la proteína a una posición de referencia mediante un potencial armónico cuya constante de fuerza fue de 1000 kJ/mol.nm². A continuación, se procedió a equilibrar la temperatura y presión de los sistemas en un proceso de dos pasos. En el primero se acoplaron a un

⁹ Los Campos de Fuerza consisten en un conjunto de ecuaciones utilizadas para generar las energías potenciales, y a partir de sus derivadas calcular las fuerzas, y los parámetros utilizados en dichas ecuaciones.

ensamble NVT con el termostato *Velocity-Rescale* (Bussi y col., 2007) durante 500 ps, manteniendo la restricción de posición y asignando velocidades aleatorias por medio de una distribución de Maxwell-Boltzmann a 300,15 K de temperatura. Luego en el segundo paso se sometieron a un ensamble NpT con el baróstato de Parrinello-Rahman (Parrinello y Rahman, 1981) durante 500 ps más, manteniendo la presión del baño constante a un 1 bar. Finalmente, para la fase de producción cada sistema se llevó a una cantidad similar de moléculas de agua (alrededor de 12000) manteniendo las condiciones fisiológicas de concentración salina, y se simuló durante 200 ns, para evaluar su evolución y asegurarse que el sistema alcanzó una condición de equilibrio. Durante las fases de producción, los grupos proteicos y no proteicos fueron acoplados separadamente al mismo baño térmico y de presión que en la fase de equilibrio. Por su parte, la longitud de los enlaces de hidrogeno se restringió utilizando el algoritmo LINCS (Hess y col., 1997), mientras que las interacciones electrostáticas se calcularon utilizando el método *Particle Mesh Ewald* (Essmann y col., 1995), aplicando un radio de corte para las interacciones de van der Waals y de Coulomb de 1,0 nm, respectivamente. Todas las simulaciones se llevaron a cabo con un paso de integración de 2 fs.

Para el análisis de las trayectorias de la fase de producción de cada DM, se centró el sistema en la proteína (función `trjconv -center -pbc nojump`) para evitar saltos en los límites de la caja de simulación, y se le quitaron las traslaciones y rotaciones (función `trjconv -fit rot+trans`) para facilitar su visualización. A continuación se analizaron distintos parámetros relacionados con la estabilidad y el tamaño de cada proteína. Para analizar la variación que tiene la posición de los átomos de la proteína a lo largo de la simulación con respecto a la posición inicial se calculó el RMSD en función del tiempo de los átomos del esqueleto (*backbone*) con la función `rms` (Maiorov y Crippen, 1995), brindando información respecto a cuánto se desvió la estructura final respecto a la inicial y su estabilidad. También se calculó la fluctuación del RMSD (RMSF) que presenta cada átomo de C alfa a lo largo de la simulación con la función `rmsf` para analizar la movilidad que tiene cada residuo y la flexibilidad de cada región de la proteína. Finalmente para analizar el

tamaño y el grado de compactación que tienen las estructuras se calcularon la superficie total expuesta al solvente en función del tiempo con la función `sasa` (Eisenhaber y col., 1995), y el radio de giro de la proteína con la función `gyrate`. La determinación del RMSD, la superficie y el radio de giro dan una idea de la estabilidad que tiene una estructura según si alcanzan valores constantes durante el tiempo de simulación. Los gráficos correspondientes a los distintos parámetros determinados se realizaron con el programa Grace 5.1.25 (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>). Para mayor detalle de los comandos utilizados ver el Anexo.

Finalmente, para visualizar y analizar las trayectorias de las simulaciones, y crear imágenes adicionales, se utilizó el programa VMD 1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) (Humphrey y col., 1996).

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudio Exploratorio de Asociación

Con el objetivo de analizar la posible influencia de los genes candidatos propuestos sobre el color de la carne bovina, se comenzó por realizar un estudio de asociación de polimorfismos, previamente reportados en dichos genes, con variables fenotípicas relacionadas al color de la carne.

3.1.1 Datos fenotípicos del Grupo G-I

Como se mencionó en el Capítulo 2, el estudio de asociación exploratorio se llevó a cabo con una población para la cual se contaba con registros de los siguientes datos fenotípicos: parámetros colorimétricos (L^* , a^* y b^*), pH y composición lipídica de la carne (AGPI y EET). En la **Tabla 4** se muestra el valor medio y desviación de las distintas variables en la población total.

Tabla 4. Media y desviación estándar de las variables fenotípicas analizadas del grupo G-I en el estudio de asociación.

Variable	N	Media	Desviación estándar
L^*	179	37,23	$\pm 2,46$
a^*	179	22,62	$\pm 2,03$
b^*	179	12,09	$\pm 1,51$
pH	179	5,49	$\pm 0,13$
AGPI	177	7,54	$\pm 2,82$
EET	179	3,11	$\pm 1,30$

AGPI está expresado como un porcentaje respecto del total de ácidos grasos, mientras que EET se refiere a la cantidad de grasa total en 100 gr de carne recuperada como extracto etéreo, como se explica en el Capítulo 2.

Brevemente, se puede observar que el valor final de pH alcanzado por las muestras se encuentra en el orden del valor de 5,5 esperado para la carne (Huff Lonergan y col., 2010). Por su parte, el valor medio observado para a^* de 22,62, correspondiente al color rojo, coincide con lo reportado en novillos alimentados con pasturas por Grigera Naón y colaboradores (2007) y Warren y colaboradores (2008), de 22,6 y 19,2, respectivamente. A su vez, la luminosidad L^* presentó valores menores a los reportados por estos mismos autores, de 40,1 y 43,9, respectivamente, aunque mayor a lo informado por Realini y colaboradores (2004) de 33,8 para animales terminados en forrajes. Con respecto al parámetro b^* , correspondiente al color amarillo, se obtuvieron valores similares a los reportados por Grigera Naón y colaboradores (2007), de 12,7, pero mayores a los de Warren y colaboradores (2008), de 8,7. Finalmente, con respecto a la composición lipídica, Realini y colaboradores (2004) informaron un porcentaje de AGPI de 9,96, en torno a lo determinado en la población del grupo G-I, pero con composición total de lípidos de 1,68%, menor a lo obtenido en nuestro caso.

3.1.2 Datos genotípicos del Grupo G-I

De los 11 SNPs genotipificados en los individuos del grupo G-I, cinco resultaron monomórficos o tenían un alelo presente en una frecuencia inferior cercana a cero (frecuencia alélica mínima permitida, $MAF > 0,05$), por lo que no fueron tenidos en cuenta para el estudio de asociación. Para los seis SNPs restantes, en la **Tabla 5** se detallan los valores estimados de frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada (h_e) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Tabla 5. Frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada (h_e) y Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Gen	SNP	Frecuencias Alélicas		h_e	HWE (p -value)
MB	MB-1	C	0,765	0,360	0,622
		T	0,235		
LDHA	LDHA-1	A	0,039	0,075	0,348
		G	0,961		
CCS	CCS-1	C	0,254	0,379	1,000
		T	0,746		
	CCS-2	C	0,109	0,195	0,758
		T	0,891		
GSTP1	GSTP1-1	A	0,422	0,489	0,397
		G	0,578		
	GSTP1-3	C	0,429	0,491	0,627
		G	0,571		

La evaluación del ligamiento entre los SNPs correspondientes a los genes LDHA, CCS y GSTP1 localizados en el cromosoma 29 resultó en dos bloques de ligamiento (**Figura 2**), que se corresponden con los genes y reflejan la distancia entre los marcadores. La distancia entre los genes CCS y GSTP1 ubicados en uno de estos bloques no es muy grande (aproximadamente 800 kb) lo que permite entender el ligamiento detectado entre ellos. Los SNPs ubicados en el gen GSTP1 estaban en ligamiento completo, resultando en tan solo dos haplotipos posibles (GG y AC) detectados en la reconstrucción de fases con las muestras estudiadas. La co-segregación de los alelos observada en cada SNP puede ser explicada por procesos de deriva génica, selección natural o cualquier otro mecanismo genético que ocurriera previo al establecimiento de las razas Angus y Hereford, dado que los haplotipos fueron encontrados en individuos de ambas razas. En el mismo sentido, no se detectó recombinación entre los marcadores de GSTP1, consistente con la distancia que los

separa (tan solo 414 pb). Por su parte, el bloque compuesto por los SNPs del gen CCS mostró tres haplotipos posibles (TT, CT y CC) indicando un cierto grado de recombinación entre los marcadores (la separación es de 13.051 pb) pero sin llegar a presentar una segregación independiente.

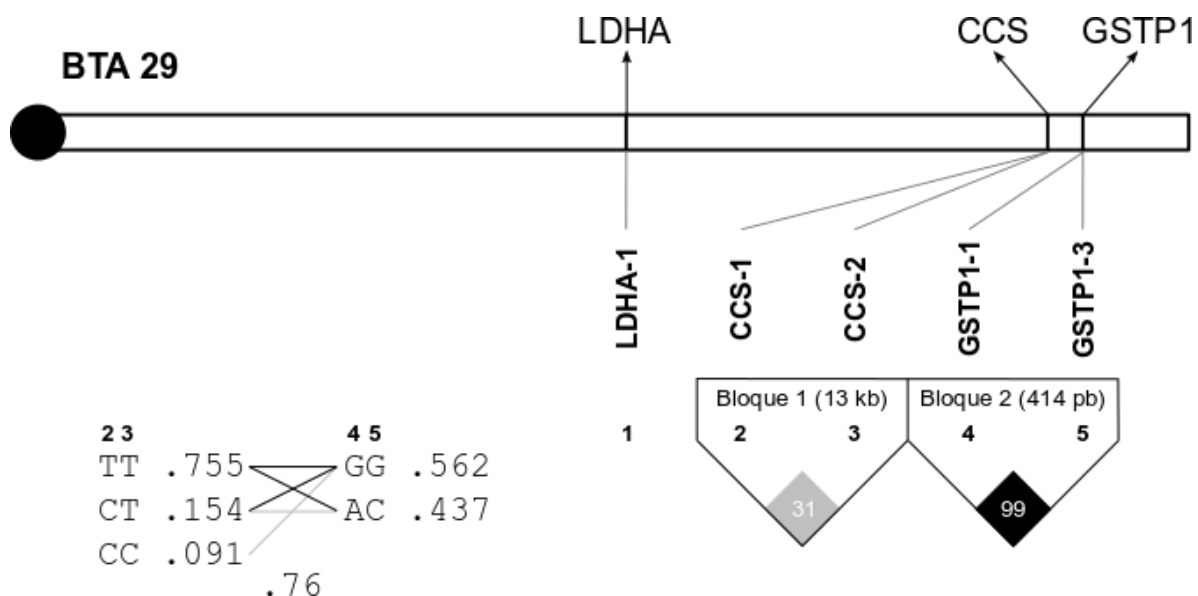


Figura 2. Esquema del análisis de ligamiento de los marcadores localizados en el Cromosoma 29, los bloques formados y los haplotipos reconstruidos.

3.1.3 Estudio de asociación

Los resultados del estudio no evidenciaron asociaciones significativas entre los marcadores genéticos evaluados para los genes LDHA, CCS y Mb, pero evidenciaron una posible tendencia para LDHA. Por su parte, se observó la asociación significativa entre los polimorfismos de GSTP1 y los parámetros colorimétricos del sistema CIELAB para el color de la carne (**Tabla 6**), indicando un posible vínculo entre este gen y el color de la carne. Específicamente, los resultados significativos se dieron con el parámetro a^* , que mide la intensidad del color rojo y que se puede correlacionar con la cantidad y el color de la Mb, y

con el parámetro calculado C_{ab}^* , relacionado con el color de la muestra. La influencia de la enzima GSTP1 sobre el color de la carne ya fue sugerida previamente en estudios a nivel bioquímico y de expresión de la proteína, como ya fue mencionado (Zhang y col., 2018).

Tabla 6. Media y desviación estándar de los parámetros colorimétricos CIELAB asociados para cada genotipo de los SNPs estudiados.

SNP	Genotipo	N	Parámetros CIELAB		
			a^*	b^*	C_{ab}^*
LDHA-1	A/G	11	21,59 ± 0,47 ^a	11,29 ± 0,36 ^b	24,37 ± 0,57 ^a
	G/G	163	22,54 ± 0,14 ^a	12,04 ± 0,10 ^b	25,57 ± 0,17 ^b
GSTP1-1	A/A	41	22,87 ± 0,25 ^A	-	25,96 ± 0,31 ^a
	A/G	85	22,69 ± 0,18 ^A	-	25,72 ± 0,22 ^a
	G/G	49	21,94 ± 0,23 ^B	-	24,86 ± 0,28 ^b
GSTP1-3	C/C	42	22,85 ± 0,25 ^A	12,24 ± 0,19 ^a	25,93 ± 0,30 ^a
	C/G	87	22,66 ± 0,18 ^A	12,09 ± 0,14 ^{a,b}	25,69 ± 0,22 ^a
	G/G	46	21,85 ± 0,24 ^B	11,61 ± 0,18 ^b	24,75 ± 0,29 ^b
Haplotipos de GSTP1	AC/AC	42	22,84 ± 0,25 ^B	-	25,92 ± 0,31 ^b
	GG/AC	86	22,66 ± 0,18 ^B	-	25,69 ± 0,22 ^b
	GG/GG	48	21,93 ± 0,23 ^A	-	24,84 ± 0,28 ^a

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores. En mayúsculas, p -value < 0,01; en minúsculas, p -value < 0,05. N: número de observaciones

Dado que ya se ha demostrado el efecto del glutatión (GSH) sobre el color de la carne (Tang y col., 2003), y que la enzima GSTP1 utiliza como sustrato al GSH, se refuerza la idea de que este gen resulta un buen candidato para explicar la asociación de esta región cromosómica con parámetros colorimétricos.

Como se mencionó anteriormente, GSTP1 participa en procesos de detoxificación celular y resistencia al estrés oxidativo (Lo Bello y col., 2001), favoreciendo la estabilidad *post mortem* de los pigmentos. En este sentido, GSTP1 cataliza la adición de GSH reducido

a especies electrófilas, como son los productos generados por peroxidación lipídica (Vasieva, 2011) que afectan la estabilidad de las proteínas. Por ejemplo, el aumento en la oxidación de la OxyMb a MetMb como consecuencia de la oxidación de lípidos ya fue estudiada por Faustman y colaboradores (2010). Dado que ambos marcadores analizados en GSTP1 están localizados en exones y resultan en sustituciones aminoacídicas sinónimas, podría suponerse que éstas no son las mutaciones responsables de las variaciones fenotípicas observadas, pero que están en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal. Sin embargo, sí podrían estar afectando directamente la velocidad de traducción de la proteína y en consecuencia su estructura secundaria o terciaria como consecuencia de la disponibilidad diferencial de cada ARNt específico para cada codón. Este efecto fue reportado por Kimchi-Sarfaty y colaboradores (2007), quienes propusieron que el número acumulado de mutaciones en las regiones codificantes de un gen podrían llevar a una estructura proteica diferente debido al tiempo disponible para la traducción y el plegamiento de cada codón específico de la secuencia. Por lo tanto, las diferencias observadas en este estudio entre los haplotipos de GSTP1 podrían tener una explicación similar¹⁰. En este sentido, se esperaría que los individuos con el haplotipo AC produzcan una GSTP1 con mayor actividad, lo que llevaría a menores concentraciones de especies reactivas producto, por ejemplo, de la oxidación lipídica, previniendo entonces la oxidación de la Mb y generando en consecuencia una mayor estabilidad del color. Nuevamente vemos que GSTP1 representa un gen candidato interesante para profundizar en el estudio de su influencia sobre la estabilidad del color de la carne.

Adicionalmente, la asociación entre marcadores en el gen de la Calpaína 1 (CAPN1) y parámetros del color de la carne (Mazzucco y col., 2010; Pinto y col., 2011) pueden relacionarse con los resultados obtenidos debido a que este gen se encuentra a 2 Mb de distancia *upstream* de GSTP1.

Los restantes genes estudiados en esta etapa fueron seleccionados en base a su rol biológico, como ser el principal pigmento proteico del músculo (Mb), por afectar la

¹⁰ Serían necesarios estudios adicionales para comprobar esta hipótesis.

estabilidad redox a través de la disponibilidad de NADH (LDHA), o estar directamente involucrado en la regulación de los procesos oxidativos en la célula (CCS y GPX4). Estudios previos ya habían sugerido que la estabilidad de la Mb, y por lo tanto del color, podría estar regulada en función a la variación en la disponibilidad de NADH como consecuencia de niveles de actividad diferencial de LDH en el músculo (Kim y col., 2009). En este sentido, podemos mencionar que el SNP de LDHA analizado en el estudio de asociación se encuentra localizado en la región 5'UTR del gen, motivo por el cual puede suponerse que podría estar afectando el proceso de transcripción del gen, lo que haría variar la concentración de los monómeros de LDHA y, en consecuencia, la proporción de homotetrámeros funcionales. Por su parte, el efecto de GSH sobre los procesos oxidativos de la célula, y por lo tanto sobre la estabilidad del color, también ya fue reportado (Lo Bello y col., 2001), por lo que los resultados obtenidos para GSTP1 también están en sintonía con esas observaciones. Por el contrario, los resultados obtenidos para los otros genes relacionados a la disponibilidad de GSH fueron diferentes, ya que CCS no tuvo resultados significativos mientras que los SNPs de GPX4 resultaron todos monomórficos en los individuos del grupo G-I y por lo tanto no pudieron ser evaluados. Hay que mencionar de todas formas que considerando sólo estos resultados no se puede descartar una posible influencia de estos genes sobre el color de la carne.

3.2 Glutación S-Transferasa P1

La superfamilia de glutatión transferasas está compuesta por diversas isoenzimas cuya principal función es la protección de las células frente a compuestos xenobióticos y productos del estrés oxidativo. Estas enzimas catalizan la conjugación del GSH con una gran variedad de compuestos electrófilos tanto endógenos como exógenos (Sheehan y col., 2001). Adicionalmente, se ha determinado la participación de estas proteínas en la regulación no enzimática de procesos de muerte celular programada (Laborde, 2010).

3.2.1 Re-secuenciación y reconstrucción de haplotipos

El análisis de la base de datos de polimorfismos dbSNP del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) mostró que los genes codificantes de las enzimas estudiadas presentan un elevado número de posiciones polimórficas, muchas de las cuales se encuentran en regiones codificantes. En consonancia, la re-secuenciación y alineamiento de GSTP1, por comparación con la secuencia de referencia, resultó en la determinación de un total de 128 SNPs (dando un valor de un SNP cada 25,6 pb), de los cuales 36 se localizaron en regiones codificantes (resultando en un SNP cada 30,2 pb). Estas frecuencias resultaron mayores a la aproximación de un SNP cada 100 pb reportado por el Proyecto 1000 Genomas Bovinos (*1000 Bulls Genome Project*, www.1000bullgenomes.com). Adicionalmente, podemos mencionar que se observa una gran diversidad de secuencia al comparar este gen en diferentes especies, que no se traduce a nivel de la proteína, sino que por el contrario, las secuencias primarias de GSTP1 presentan un elevado grado de conservación de sus residuos (**Figura 3**).

Centrándonos en las posiciones polimórficas de las regiones codificantes del gen vemos que los 36 SNPs se localizaron tanto en exones (15), como en el promotor (13) y en la región 5'UTR (8) (**Figura 4**). Teniendo en cuenta todos estos marcadores, se obtuvieron un total de 24 posibles haplotipos. Para analizar la diversidad proteica, se consideraron solamente los SNPs localizados en exones, obteniendo un total de 11 posibles ARNm teóricos (p-ARNm) (**Tabla 7**). Para profundizar, la traducción de esos p-ARNm daría tan solo siete posibles secuencias primarias diferentes (p-Prot), incluyendo 11 sustituciones no sinónimas de aminoácidos distribuidas entre las distintas razas, con respecto a la secuencia de referencia (NP_803482.1) (**Tabla 7**).

	*	*		**	*	*	*		*	*	*	*									
1	MPPYTTIV	FPVQGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVAMQS	W	LQGP	--	LKASCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRTLG	78		
1	MPPYTTIV	FPTRGR	CEALRML	LADQGS	WKE	EVVTKE	S	W	LQGP	--	LKASCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSFG	78	
1	MPPYTVV	FPVRGR	CAALRML	LADQGS	WKE	EVVTVE	T	W	QEGS	--	LKASCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNT	ILRHL	GRTLG	78	
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVTKE	S	W	LQGP	--	LKASCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSFG	78	
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVTI	D	T	W	QGL	--	LKPTCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSLG	78
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVNKE	T	W	LQGP	--	LKASCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSLG	78	
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVTMET	W	KGS	--	LKASCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSLG	78		
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVTMET	W	P	--	LKPSCL	F	R	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSFG	76
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVTS	D	T	W	QGS	--	LKASCVY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSLG	78
1	MAPPYTLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPPYTTIV	FPVRGR	CEAMRML	LADQGS	WKE	EVVTI	D	T	W	QGL	--	LKPTCLY	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRSLG	78
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT	YFAVKG	RCGALK	IMLADK	QQLKEN	LVTFEE	W	KMGD	--	LKATCVF	G	Q	LPKFQD	GD	LTLY	Q	SNA	ILRHL	GRKHA	78	
1	MPGYVLT																				

Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína GSTP1 de diferentes especies. El alineamiento se realizó con la herramienta para alineamiento múltiple disponible en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) incluyendo la secuencia de GSTP1 de diferentes especies. La imagen muestra la conservación de los residuos: en rojo se muestran los residuos conservados, en azul las columnas que no tienen gaps, y en gris las columnas que sí contienen gaps. Cuando más del 50% de las secuencias contienen un gap en una posición, los residuos se muestran en gris y en minúscula. Los asterisco (*) indican las posiciones con sustituciones aminoacídicas encontradas en la re-secuenciación. Resaltado en amarillo se ven los residuos involucrados en la interacción con el sustrato GSH. Las secuencias utilizadas son: *B. taurus* (NP_803482), *B. indicus*(XP_019810805), *H. sapiens* (NP_000843), *P. troglodytes*(XP_001152516), *O. aries*(XP_011972865), *M. musculus*(NP_038569), *F. catus*(XP_023095898), *C. lupus familiaris*(NP_001239096), *S. scrofa*(JAA74207), *I. tridecemlineatus*(XP_005333392), *D. rerio*(NP_571809), *S. harrisii*(XP_023354429), *X. laevis*(NP_001082252).

```

1   aggactctccaggcaagaataactggagtggtgtgtcatgacctcctccaaggatcttcc
61  caaccagggatggaaccaggggtctcctggactggcaggcgggttctttaccactagcac
121 cacctgggaagcccaattcatgtttaattaattaattcagataaaaaatggttaaggaagg
181 ggcagcagggcacatgagtcatacaagaaccacgggtggcctccaaacgggtccacgggt
241 ctgaaaagccaacctagggcgtgagctgggtgtgtgcgcgttcgggtgcacaggggtgtgtc
301 tccgtctttgtgtgcagcatctgcctttTG TCTGTGGAAC AAGTGTCCACACGCAGGGT
361 TTGCGTGTCT GGGGTCTAC/G A (C) CCCACTAG/T GGGTCGGACC GCGCGGA (C) CC TCCGA/G GTTCT/C
421 G/AGAAGCCCTC GGCCATCAGA GCCCGCGGGA CGTTCAGCAA TCGGTCCCGG CGAGCTGCGG
481 GCCCCCAGGG GATGGAGATT AAGCGGTGGG GCGGGGGGCG GCGGCGCAG/A GGCTC/A GTGGC
541 CAGAGCCA/G TG ACTCAGCACG GGGGGCGGGC CGGCCAGCCG AG/A CCGCGCCT GCGGGGAG/A
601 GCGGGGGCGG GCGCGGCCA CCG (C) TATAAG GCTCAGGCCG C/ACGC/G/G/ACGA/GCG CGCTGGAG/ACT
661 TTGCTGCCGC CGC/GCACCTTT ACCGACTTCC CCGAC/TTCCA/G GAAGTGAGTTC CCCGTTGCCT
721 GGGGCTCCCA GGGATTCCGA GGGGGGCGCC CAGGGTGTIT GGGGGGGCAG GTGGGGCTCT
781 CGAGGGGGCG GGCTAGAGCG CCCAGAGCCG GGGATGGGAC CCCCAGGGAG GACGGGCCAG
841 TGTCGTCTCC CCCGGAACAG GCCTCTCCCG CCGCTAACTG GCTTCTTGT GCATCCTGCA
901 GTGCCTG/TCC/T ACACCATCGT CTACTTCCCG GTTCAAGTA GGGACCTGGG ACGGCGGGG
961 TGGGGCGGGA GGGGAGCCAG AAGTTGAGGG CTGCAGCCCA CACCCCGGT TTTTCCCCTG
1021 GCATCAGTG GCTACTAACT CGAGCCTCCT TCCTGGGCCC CGGAGCTGCC CGGGCTAGCG
1081 TACTTCTAGC CTCCCGGCCT TGGCCCGCCC CTCCGCCGTG TGCTGTGAGG TCTTCCGAGC
1141 AGTCCCAGC CCCCTTGGCC CCGCCAGG GCACTGCCA CCCTCATTGC CCCGTCTCC
1201 CCTCCCTCAG GCGCTGC/GA G/AGCCATGCG ATGCTGCTGG CCGACCAGG CCAGAGCTGG
1261 AAGGAGGAGG/T TCG/TTAGCC/AAT GCAGAGCTGG CTGCAGGGC C/AAC/TTCAAGC CTCCT/GCGCTG
1321 AGTACTTTTG TCCCGTCCCC GGCTCAGGGG CTGGACCTTG TGGGGGCGG TGGGAGGCGC
1381 AACACTGGG TGAGGGGCG CCGAGCTCAG CGTCTCTGAC AGAGCTGTGC GTCCCCCAG
1441 CTGTACGGG AGCTCCCCAA GTTCCAGGAC GGAG/AACCTCA CGCTGTACCA G/TTCCAATG/ACC
1501 ATCCT/AGCGGC ACCTGGGCGG CACCTCGGT GAGTCCTGGC ACTACAAGTG GTCAGCCCA
1561 GGCTGGGGCG GCAGGCATCA GCCAGCCTTC CTGAGCACCT GCTGAGCCTC CTCCATGTCA
1621 ATCAAATCGC CCAGCCACCC TGTGGAATGG AGGCGTGTG AGGTATCTA GGGCTTGCTT
1681 GGTAGCTCAG TTGGTAAAGA ATCTACCTGC AATGCAGGAG ACCCGGGTTC CATTCTGGG
1741 TCAGGAAGAT ACCCTGGCGA AGGATAGGC TACCCACTCT AGTATTCTTG GGCTTCCCTT
1801 GTGGCTCAGC TGGTAAAGAA TCCACCTGCA GTGCTGGAGA CCTGGGTTG ATCCCTGAGT
1861 TGGGAAGATC CTGCCTTAG AGTGGGGCCA CCTGCCCTGA ATTCCGGGCG CGGACTCAGC
1921 CCCTTTCTTC CTGCGCATCC TCCTCCCTCC TGCTGGCCC AGGGGCACG GCAGCCACAT

```

Figura 4. Región amplificada y posiciones polimórficas encontradas por re-secuenciación ubicadas en zonas codificantes. La región amplificada se muestra en letras mayúsculas, los exones están resaltados en amarillo, y las regiones 5' y 3' UTR en turquesa. ^{N1/N2}: indica los alelos de cada SNP detectado. (N): indica una delección encontrada para esta base.

```

1981 GGCCTGGCTG CAGGGCGCTG GGGGGTCATG TTGCCGTGGC TTTCAGGCTC CCACTCATGC
2041 CCTCTGCTCT CCCGCCACCC CAGGGCTGTA TGGGAAGGAC CAGCAGGAGG CGGCCCTGGT
2101 GGACATGGTG AATGACGGTG TAGAGGACCT TCGCTGCAAA TACGTCTCCC TCATTTACAC
2161 CAACTACGTA AGCGCAGGCG TCGGGGTGGA CACGGAGGAC AAAGAAAGAA AGGGGCTTTT
2221 TCCTTCTCAC CCTATACTGC CCCCCTCTTG TGGCTCTGGC TGATCCCCGC CTGGGGCTGC
2281 TTCTGTTTCT GGGTGGGGGG GTGGGAATCA AGAGCCACTG TAGACCAGAC ACACCTTTCT
2341 GCCTCCCTGC CTGGGGGAGG GACTGGTCAG GTAGCAGTGC ACTGCAGAAC GGTGCTAGGA
2401 CAGGAGACGA CCAGCCAGAG GTGGTTCCCT GATCCTCAGC CCGGGGAGGT CAGGAGGGCT
2461 TCCTGGAGCA GGTGCAGAAG GAGGAGCTTC TGGAAGGGAT GCTGGTACTT TCGGATGCAC
2521 GAAGTGTGCA GGCAGAGGGC ACATCTGGGC ACTTGGGAGC AGTTTCGCAG AGGCAGGGTG
2581 TGCCTCTGTG TGCGAGCAAA TGAGAGTGTC AGGAGATGAA TGGAGCTGGA GGGACAGCAG
2641 GCCCGCTCCT GAAGGCCTCG GCCAGCTGGC TTGGAGATGC GCTTTGGGGG GTCTAAGCAG
2701 GCGGGTGTCT GTGCGATCTG GAAAGATCCT GTGAGGCTTT TGCAAGGCTG GGGAGCGATC
2761 ATGACAAGAC TGGACAAGAG GAGACTCAGC CTCTGAAATG GACAGGATGT GGCAATAGCC
2821 TGGGGGGAGG TGAGGAGAGC AGGGCAGGGC TGGGCGAGTG GCCATCCTCT CATCCCCGGG
2881 GCGGGGGACG GGACGCGACG GGATGGCAGC ATGCCAGGGC CAGGAGGATG ATACCCAGCG
2941 GCCTCTCTCT GGCAGGAGGC A/GGCAAGGAG GACTATGTGA AGGCGCTGCC CCAGCACCTG
3001 AAGCCTTTTCG AGACCCTGCT GTCCAGAAC AAGGGTGGCC AGGCCTTCAT CGTGGGCGAC
3061 CAGGTGAGCT GGCCCCACCC CGCCCCCTTCT GCACCCCGCT CTGTCCAGAT GGCACAGCCG
3121 TGCAGAGACA GCACGGGAGT CATGGGTTCA GCAAAGCTGG GGAATGCCCTT GGGCGCCCTG
3181 CCCCCCAACT CCCACGCCCC CTGAGTCCCA TCCTGCTCTG CCCTGCAGAT CTCCTTTGCG
3241 GACTACAACC TGCTGGACCT GCTTCGGATT CACCAGGTCC TGGCCCCCAG CTGTCTGGAC
3301 TCCTTCCCCC TGCTCTCAGC CTACGTGGCC CGTCTCAACT CCCGGCCCCA GCTCAAGGCC
3361 TTCCTGGCCT CCCCAGGAGCA CATGAACCGG CCCATCAACG GCAATGGGAA ACAGTGAGGG
3421 CTTGTGGCAC TCTCTGCGCG AGGCAGGGGG CTGCTGTTC TTCCTTTCCC CAGGACCAAT

```

Figura 4 (continuación). Región amplificada y posiciones polimórficas encontradas por re-secuenciación ubicadas en zonas codificantes. La región amplificada se muestra en letras mayúsculas, los exones están resaltados en amarillo, y las regiones 5' y 3' UTR en turquesa. ^{N1}/_{N2}: indica los alelos de cada SNP detectado. (N): indica una delección encontrada para esta base.

Tabla 7. Haplotipos reconstruidos (p-ARNm), p-Prot y sustituciones aminoacídicas en las distintas razas del grupo G-I.

Haplotipo/ p-ARNm	Aminoácido														p-Prot	Razas
	3	15	16	33	34	35	43	44	48	60	65	68	70	114		
Referencia (NP_803482.1)	P	C	E	V	V	A	P	L	C	D	Q	A	L	A	-	
CCCCGGGCCCTGGGTG																An, Br, Cf, He, Ho, Ne, Wa
CCCCGGGCCCTGGGTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CCCCGGGACCTGGGTG																
CCCAGGCCCTGGGTG																
CCCCGGGCCCTGGGAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	II	Br
CCCCGTAATGGGGTG	-	-	-	-	L	-	Q	F	G	-	-	-	-	-	III	Cr
CCCCGTCCCTGGGTG	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IV	Ho
CCGGGGCCCTGGGTG	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	Ne
CCCCGGGCCCTGGATG																An
CTCGGGCCCTGGATA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	VI	
TCCGGGCCCTTATGAG	S	-	-	-	-	-	F	-	-	N	H	-	Q	-	VII	Br

3.2.2 Estudio in silico de las sustituciones no sinónimas

Los polimorfismos genéticos que generan sustituciones no sinónimas en las proteínas (nsSNPs) son factores de gran importancia que contribuyen a la diversidad funcional de las proteínas dentro de una población y entre poblaciones. En este sentido, la

capacidad de predecir las consecuencias funcionales de las variantes genéticas ayudaría a comprender los mecanismos moleculares subyacentes responsables de la variabilidad fenotípica observada. Como ya se mencionó, los SNPs sinónimos podrían derivar en moléculas de ARNm con tasas de traducción diferentes, lo que tendría un efecto sobre el plegamiento de las proteínas, generando conformaciones alternativas y en consecuencia la actividad enzimática total podría variar (Kimchi-Sarfaty y col., 2007). En el caso de los estudios realizados para esta tesis, se analizó la estructura terciaria predicha para las diferentes secuencias de aminoácidos de la proteína del gen GSTP1 sin considerar las mutaciones sinónimas, ya que estas no generarían cambios en su estructura primaria. En el mismo sentido, los SNPs localizados en el promotor o regiones regulatorias y en los intrones podrían tener un efecto sobre el fenotipo como consecuencia de niveles de expresión diferenciales o por conformaciones del ARNm alteradas (Ramírez-Bello y Jiménez-Morales, 2017; Shastry, 2009).

Para determinar si las sustituciones no sinónimas de aminoácidos identificadas tienen un efecto sobre la estabilidad o la función de la enzima GSTP1, profundizamos el análisis de las variantes utilizando seis servidores de predicción *in silico*: SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, PANTHER, MutPred 2 y I-Mutant 3.0, que se basan en algoritmos de análisis enfocados en la secuencia y/o estructura de la proteína. La **Tabla 8** resume los resultados obtenidos para el análisis individual de cada sustitución. También se utilizó el servidor *Project HOPE*¹¹ para obtener mayor información del efecto de las sustituciones en la estructura y función de la proteína. Es importante remarcar que todos estos son programas de análisis de mutaciones puntuales, en los que se compara la estabilidad de una proteína con un único residuo mutado, respecto al consenso reportado.

¹¹ Al mes de septiembre de 2019 el servidor del *Project HOPE* dejó de ser de libre acceso.

Tabla 8. Resultados del análisis individual de las sustituciones aminoacídicas con las herramientas *in silico* SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, PANTHER, MutPred 2 y I-Mutant 3.

Posición	3	15	33	34	43	44	48	60	65	68	70
Residuo en la referencia	P	C	V	V	P	L	C	D	Q	A	L
Residuo alternativo	S	W	F	L	Q	F	G	N	H	T	Q
SIFT ^a	0,30	0,02*	0,10	0,12	0,50	0,23	0,05*	0,06	0*	0,34	0*
PROVEAN ^b	-2,135	-5,652*	-3,459*	-2,043	0,162	-1,498	-7,753*	-3,634*	-4,704*	-2,102	-5,315*
PolyPhen-2 ^c	0,006	1*	0,097	0,001	0,018	0,017	0,279*	0,021	1*	0,979*	1*
PANTHER ^d (millones de años)	176	176	361	750*	86	361	750*	750*	750*	1629*	750*
MutPred 2 ^e	0,483	0,898*	0,279	0,220	0,236	0,121	0,822*	0,441	0,897*	0,829*	0,928*
I-Mutant 3.0 ^f (Kcal/mol)	-1,18*	-1,02*	-1,01*	-0,81*	-0,95*	-0,88*	-1,21*	-0,06	-1,15*	-0,75*	-2,58*

* Indica los resultados significativos de cada análisis. ^a *p-value* < 0,05: dañino; 0,05-0,10: potencialmente dañino; > 0,10: neutral. ^b puntaje < -2,5: deletéreo; > -2,5: neutral. ^c probabilidad > 0,85: probablemente dañino; 0,15-0,85: posiblemente dañino; < 0,15: benigno. ^d tiempo de preservación > 450: probablemente dañino; 200-450: posiblemente dañino; < 200; probablemente benigno. ^e probabilidad > 0,8: patogénico; < 0,8: no patogénico. ^f cambio en la energía libre de Gibbs de desnaturalización (DDG) < -0,5: gran descenso de la estabilidad; -0,5-0,5: neutral; > 0,5: gran aumento de la estabilidad.

Brevemente, podemos mencionar que SIFT y PROVEAN clasificaron a las variantes de manera equivalente, asignándole a las sustituciones C15W, C48G, Q65H, L70Q, V33F y D60N el valor de dañinas/potencialmente dañinas y deletéreas, respectivamente. El resto de las variantes resultaron neutrales en ambos casos. De esas seis variantes marcadas, PolyPhen-2 y PANTHER detectaron cuatro y tres, respectivamente. Además, PolyPhen-2 detectó una nueva sustitución probablemente dañina (A68T), mientras que PANTHER clasificó otras dos como posiblemente dañinas (V33F y L44F). Adicionalmente, se realizó un análisis de las variantes con I-Mutant 3.0 para sumar un nivel más a la caracterización, considerando el cambio en la $\Delta\Delta G$ entre las estructuras de referencia y alternativas de la proteína. En este caso se observó un descenso significativo de la energía en casi todas las sustituciones, siendo el mayor cambio de -2,58 Kcal/mol para la variante L70Q.

Cada uno de los servidores utilizados cuenta con algoritmos que utilizan distintos parámetros para realizar la evaluación de las sustituciones aminoacídicas, por lo que los resultados obtenidos fueron analizados como un conjunto, dándoles mayor fuerza. Dicho de otra manera, a mayor cantidad de resultados significativos en los distintos programas para una determinada sustitución, más probablemente esa variante afecte a la estructura y función de la proteína. En ese sentido, mientras que algunas sustituciones parecieran no tener ningún efecto (P3S, P43Q, L44F), o tener una baja influencia (V33F, V34L) sobre la estructura y función de GSTP1, otras tendrían una influencia mayor (C15W, C48G, D60N, Q65H, A68T, L70Q). Específicamente, el análisis funcional brindó resultados concordantes de todas las herramientas indicando que las sustituciones C15W, C48G, Q65H y L70Q podrían tener un efecto sobre la proteína.

Profundizando, la predicción basada en la estructura de GSTP1 realizada con I-Mutant 3.0 mostró que casi todas las posibles sustituciones serían muy desestabilizantes (tan solo D60N tendría un efecto neutral en la estabilidad de la proteína), lo cual concuerda con el elevado grado de conservación observado para esta proteína entre distintas especies (**Figura 3**).

3.2.3 Evaluación del efecto de las sustituciones no sinónimas en la estructura y función de GSTP1

Para profundizar el estudio de las sustituciones aminoacídicas y analizar su impacto sobre la estructura y función de la proteína, las evaluamos con el servidor HOPE. De manera general, los resultados indicaron que en la mayoría de los casos los residuos mutante y nativo diferían en sus propiedades, en concordancia con lo expuesto en la sección anterior. Todas las sustituciones ocurrían en el dominio N-terminal de GSTP1, en donde se encuentra localizado el sitio de unión para GSH. Adicionalmente, ocho de los residuos se encontraban en contacto con otro dominio de la proteína (P3S, V33F, V34L, P43Q, L44F, C48G, D60N, L70Q), por lo que su sustitución por un aminoácido diferente podría modificar interacciones específicas entre dominios.

Brevemente, podemos mencionar que en la mayoría de los casos los aminoácidos fueron sustituidos por residuos de mayor tamaño (con excepción de P3S y C48G), lo que llevaría a posibles problemas estéricos que podrían afectar el correcto plegamiento de la proteína. Además, algunos de los residuos fueron sustituidos por aminoácidos menos hidrofóbicos (P3S, P43Q, C48G, A68T, L70Q), lo que generaría una pérdida de interacciones hidrofóbicas de gran importancia, por ejemplo, para la estabilidad de la proteína. Por otro lado, dado que algunos residuos se encuentran cerca (C15W y L44F) o directamente involucrados (Q65H) en la unión del sustrato GSH, su modificación podría alterar la conformación local del sitio activo y en consecuencia modificar la actividad de la proteína. Finalmente, el análisis de la estructura primaria de proteínas homólogas mostró que muchas de las posiciones analizadas no se encuentran completamente conservadas, de manera tal que algunos de los nuevos residuos presentan propiedades similares a sus pares de proteínas homólogas (V34L, P43Q, L70Q), mientras que otros presentaban propiedades diferentes (P3S, V33F, C48G). En dos casos el residuo mutante aparecía como un posible aminoácido alternativo en proteínas homólogas (L44F y D60N), lo que indicaría que son sustituciones más probables.

En conclusión podemos mencionar que, dado que todas las sustituciones se localizaron en el dominio N-terminal, resultarían importantes para la unión de otras moléculas y para la actividad de GSTP1, especialmente la glutamina de Q65H que participa directamente en la unión de GSH. Dado que el sitio activo de la enzima se encuentra en una hendidura entre los dominios N- y C-terminal (**Figura 5**), podemos mencionar que los residuos ubicados en este bolsillo definirán la especificidad de unión para el segundo sustrato. Adicionalmente, se ha observado que esta proteína participa de modo no enzimático en las vías de muerte celular programada (Laborde, 2010), por lo que cualquier variación estructural podría derivar también en alteraciones en la regulación de estos procesos. Entonces para concluir podemos decir que cambios en las interacciones moleculares y en el plegamiento pueden llevar a alteraciones en la estructura y función de la proteína, generando variantes que estarían involucradas funcionalmente en una estabilidad oxidativa y desarrollo de la apoptosis *post mortem* diferenciales, y que en consecuencia podrían estar involucradas en diferencias en caracteres fenotípicos del ganado.

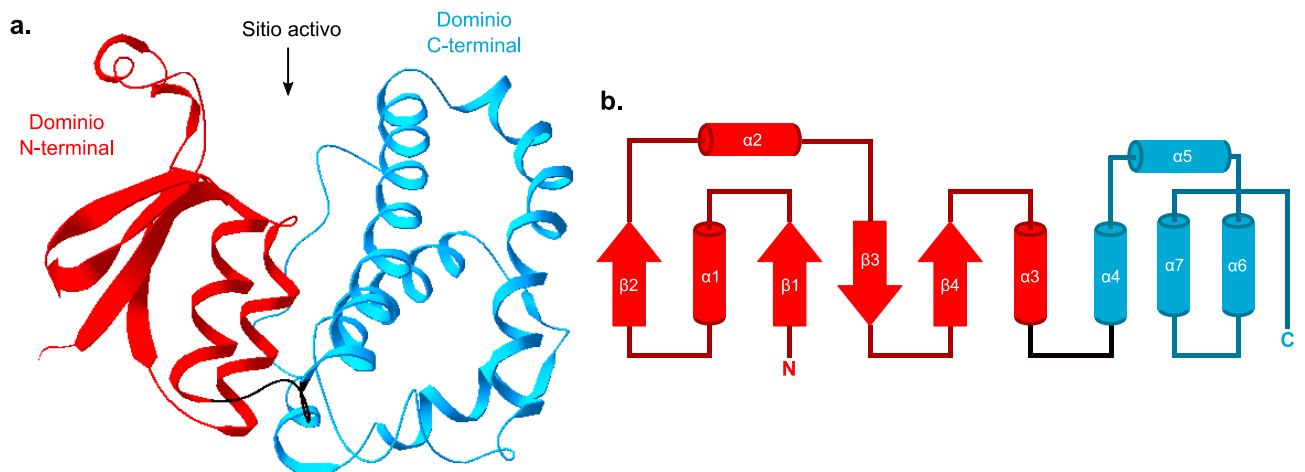


Figura 5. Estructura de la enzima GSTP1. a) Diferenciación entre los dominios N-terminal (residuos 1 a 77; en rojo) y C-terminal (84 a 210; en celeste), y localización del sitio activo. b) Diagrama de topología de los diferentes fragmentos de estructura secundaria de cada dominio.

3.2.4 Modelado por homología y análisis de la estructura proteica

Hasta aquí todas las sustituciones fueron analizadas de manera individual. Por lo tanto, para poder comparar el efecto total resultante de diferentes mutaciones, se analizaron los haplotipos obtenidos a partir de la re-secuenciación de ADN. Como se mencionó previamente, se obtuvieron 11 posibles haplotipos (p-ARNm) en el análisis de fases de los genotipos encontrados en el gen, y de ellos se infirieron siete posibles proteínas con secuencias primarias diferentes (p-Prot), como consecuencia de las combinaciones encontradas de mutaciones sinónimas y no sinónimas.

Desafortunadamente, aún no se cuenta en la base de datos de proteínas PDB con una estructura cristalizada de la GSTP1 bovina, por lo que todas las estructuras tridimensionales fueron generadas por modelado con el servidor I-TASSER, y poder así comparar las estructuras de referencia y alternativas. En el caso de la GSTP1 nativa, se utilizó para el modelado la secuencia de referencia disponible en NCBI (NP_803482.1), mientras que para las proteínas mutantes se utilizaron las siete p-Prot traducidas de los 11 p-ARNm. I-TASSER está configurado para diseñar y mostrar como resultado los cinco mejores modelos alternativos que pueda construir. Sin embargo, tan solo se generó una única estructura para cada una de las siete p-Prot y la proteína nativa, demostrando el elevado grado de conservación de estructura que presenta esta familia de proteínas. Como ya se mencionó previamente, el alineamiento de la secuencia proteica de la GSTP1 de diferentes especies mostró una baja variabilidad de residuos, particularmente en aquellos involucrados en la unión de GSH, que se encontraban completamente conservados (**Figura 3**).

Las estructuras obtenidas de esta manera fueron analizadas con el software Swiss PdbViewer. En la **Tabla 9** se resumen las determinaciones del área y volumen correspondientes a la proteína total y al sitio activo en particular, al igual que la determinación de la desviación entre los átomos del esqueleto de las p-Prot con respecto a la secuencia de referencia modelada, por medio del parámetro RMSD. Nuevamente, como

no se cuenta con una estructura cristalizada de la GSTP1 bovina, con fines comparativos se utilizó la estructura 5GSS_A correspondiente a la proteína de humano. Esta proteína tiene un 86% de identidad de secuencia con la enzima bovina, con un 97% de similitud de residuos, por lo que podemos decir que es una proteína muy parecida, y por lo tanto muy útil para realizar comparaciones.

Tabla 9. Área superficial y volumen de la proteína y del sitio activo, para las distintas p-Prot, y RMSD respecto a la estructura del consenso.

p-Prot	Proteína total		Sitio Activo		RMSD
	Área	Volumen	Área	Volumen	
I	9493	25525	743	741	-
II	9142	25782	818	762	0,378
III	9365	25802	884	1102	0,473
IV	9331	25673	745	757	0,411
V	9211	25769	701	650	0,448
VI	9467	25751	469	464	0,486
VII	8975	26004	666	633	0,419
5GSS_A	8969	25119	858	794	0,595

El RMSD se determinó entre el esqueleto (*backbone*) de las estructuras superpuestas.

Como veremos, el modelado de la estructura terciaria de las proteínas permite profundizar el análisis del efecto de las posibles sustituciones aminoacídicas sobre la estructura. Podemos comenzar por mencionar que la secuencia consenso de la proteína se encontró en todas las razas analizadas, coincidiendo con la p-Prot I (**Tabla 7**), y que su estructura modelada presentó una leve desviación de la superficie y volumen del sitio activo con respecto al de la proteína humana. Por el contrario, se destacaron cambios más notorios en el sitio activo del resto de las estructuras, de las cuales cuatro tenían una única

sustitución (p-Prot II, IV, V y VI), mientras que las estructuras p-Prot III y VII presentaban múltiples sustituciones.

El análisis computacional de las sustituciones en la p-Prot IV (V33F) y VI (A68T) no resultó concluyente respecto a su efecto sobre la estructura de la proteína. En el caso de V33F, la valina hidrofóbica se sustituyó por una fenilalanina también hidrofóbica y de mayor tamaño, pero dado que este residuo se encuentra sobresaliendo en la superficie, podría no estar ejerciendo un efecto relevante. Por el contrario, la estructura modelada de p-Prot VI presentó la mayor desviación respecto del consenso de acuerdo al RMSD, lo que puede observarse también en una reducción del volumen y superficie del sitio activo a casi la mitad. La sustitución A68T produce un cambio en las propiedades del residuo, ya que la alanina no polar es reemplazada por una treonina capaz de generar nuevos puentes de hidrógeno en la zona del sitio activo (**Figura 6**). Vale la pena mencionar que esta sustitución se dio en un animal de la raza Angus, mundialmente reconocida por la calidad de su carne (Chambaz y col., 2003; Wheeler y col., 2005), por lo que es una variante interesante para estudiar con mayor profundidad.

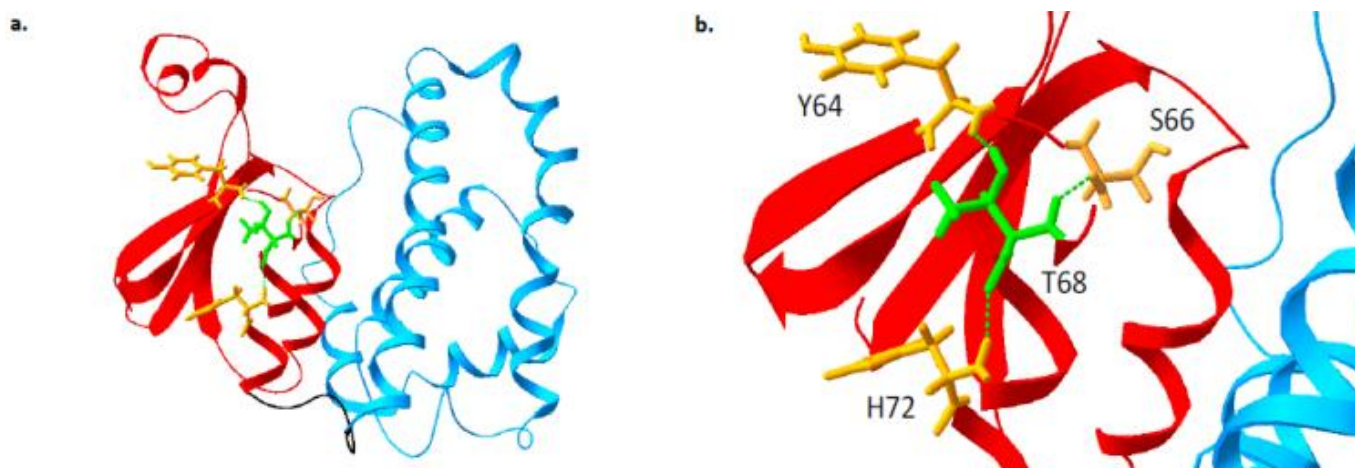


Figura 6. Estructura modelada de p-Prot VI. Los dominios N-terminal (rojo) y C-terminal (celeste) se muestran en formato de cintas, y el nuevo residuo de treonina se resalta en verde. Los residuos con los que interactúa se muestran en naranja y los puentes de hidrógeno formados en línea punteada verde.

En el caso de las otras dos estructuras con una única sustitución, p-Prot II y V, de acuerdo al análisis bioinformático presentaban un cambio dañino para la estructura y función de la proteína de acuerdo al análisis bioinformático. En ambos casos el residuo se encuentra en el interior de la estructura, por lo que su sustitución podría afectar su plegamiento. En el caso de C15W de p-Prot V, observada en la raza Nelore, la cisteína pequeña e hidrofílica fue sustituida por un triptofano hidrofóbico y de gran tamaño, que podría generar problemas estéricos. Nuevamente, esto se evidencia tanto en la reducción de la superficie y volumen del sitio activo, como en los valores de RMSD que muestran su desviación respecto a p-Prot I. Por el otro lado, aunque ambos residuos de L70Q (detectada en la raza Brahman) son grandes, la aparición de una glutamina polar podría generar una interrupción de interacciones dentro del núcleo de la proteína.

En el caso de las estructuras p-Prot III y VII, la presencia de múltiples sustituciones aminoacídicas se vio reflejada en los resultados estructurales. En p-Prot III, el incremento en el volumen del sitio activo puede explicarse por la sustitución de una prolina muy rígida en P43Q y la introducción de una glicina de gran flexibilidad en C48G, dentro de una α hélice cercana al sitio activo (**Figura 7a**). Esta estructura se encuentra localizada dentro de un *loop* que conecta los dos motivos estructurales típicos del plegamiento de tipo tiorredoxina que conforma la estructura del dominio N-terminal de las GSTs (Frova, 2006). Adicionalmente, el residuo de cisteína en la posición 48 es de importancia para la formación y estabilización del dímero, y su sustitución altera la actividad enzimática (Deponte, 2013). Aunque no fueron evaluadas como dañinas, el resto de las sustituciones de esta estructura también se encontraron en ese mismo *loop* (**Figura 7b**), posiblemente contribuyendo a las diferencias observadas en el volumen y superficie del sitio activo. Por otro lado, la p-Prot VII (**Figura 8**) incluye la que probablemente sea la sustitución más importante, Q65H, en la que, como se mencionó anteriormente, se sustituye un residuo directamente involucrado en la unión del sustrato GSH. Además, la superficie y volumen del sitio activo en esta estructura se vieron muy reducidos, por lo que resultaría interesante estudiar esta variante *in vitro*, dado que se

esperaría observar un cambio en la unión del sustrato y, por lo tanto, en la actividad enzimática.

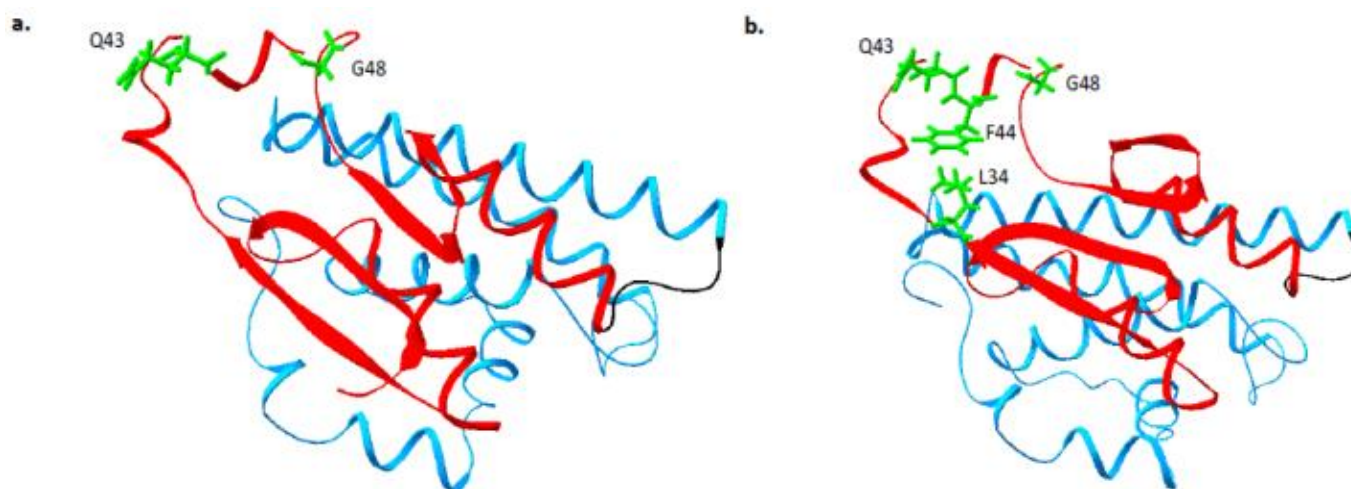


Figura 7. Estructura modelada de p-Prot III. Los dominios N-terminal (rojo) y C-terminal (celeste) se muestran en formato de cintas, y los nuevos residuos se resaltan en verde. **a)** Se destacan las sustituciones P43Q y C48G (identificadas como dañinas). **b)** Se observan las sustituciones presentes en la p-Prot III, todas ubicadas en el mismo *loop*.

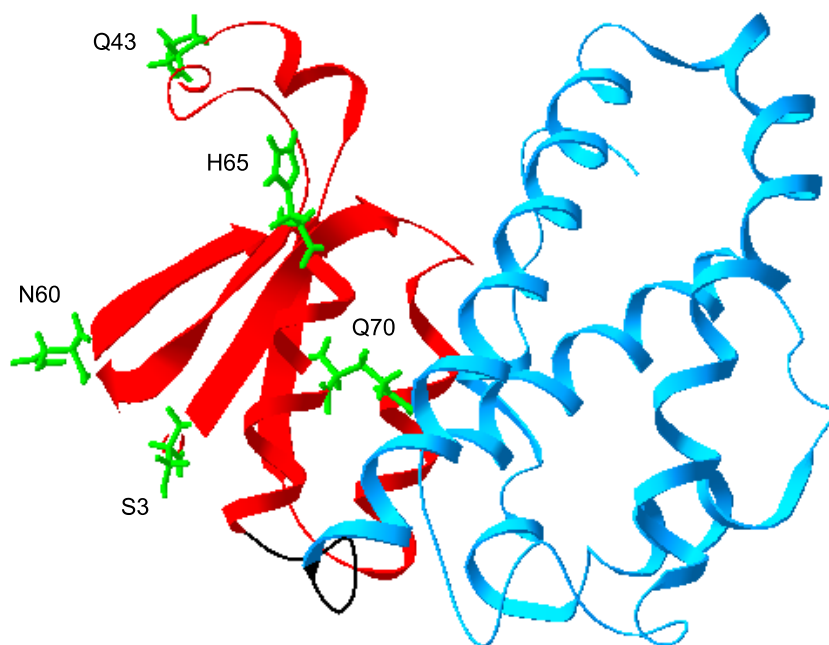


Figura 8. Estructura modelada de p-Prot VII. Los dominios N-terminal (rojo) y C-terminal (celeste) se muestran en formato de cintas, y los nuevos residuos se resaltan en verde.

En conclusión, algunas de las sustituciones aminoacídicas predichas podrían generar cambios importantes en la estructura y función de la proteína, y resultan buenos candidatos para ser estudiados con mayor profundidad en experimentos *in vitro*. Estos cambios podrían afectar la actividad enzimática, al alterar la afinidad por los sustratos, la velocidad de la reacción o la liberación de los productos, o sus funciones no enzimáticas, al variar las interacciones proteína-proteína. Además, el análisis de haplotipos destacó que las estructuras predichas III, VI y VII presentaban las mayores desviaciones en la estructura proteica o en el volumen y superficie del sitio activo, por lo que se deberían priorizar en futuros estudios.

3.2.5 Estudios basados en dinámica molecular

Como se mencionó anteriormente, los análisis *in silico* son herramientas muy potentes que permiten estudiar los sistemas biológicos a bajo costo, y cuyos resultados permiten orientar los estudios *in vitro* o *in vivo* posteriores que deban realizarse. Específicamente, los estudios de dinámica molecular (DM) buscan analizar y predecir el comportamiento que tendrán las moléculas biológicas, como las proteínas, en determinadas condiciones ambientales. En este sentido, para profundizar los análisis realizados hasta el momento, se simularon por DM las estructuras proteicas modeladas con el servidor I-TASSER para cada una de las p-Prot, y se estudió su comportamiento en condiciones fisiológicas. Las distintas variables analizadas para cada sistema están relacionadas con el grado de movilidad, flexibilidad y tamaño que presentan las proteínas, y su variación en el tiempo de simulación.

En primer lugar, se puede analizar la evolución que tiene la estructura de las p-Prot en el tiempo de simulación, a través del cambio en el RMSD de cada una de ellas con respecto a las posiciones atómicas de la estructura en el comienzo de la dinámica. En la **Figura 9** se observa que las distintas p-Prot alcanzan valores relativamente constantes del RMSD, llegando a estructuras en equilibrio a la temperatura del sistema y que no se alejaron

demasiado de la estructura inicial, siendo las que más se apartan p-Prot III y IV (alrededor de 0,55 nm).

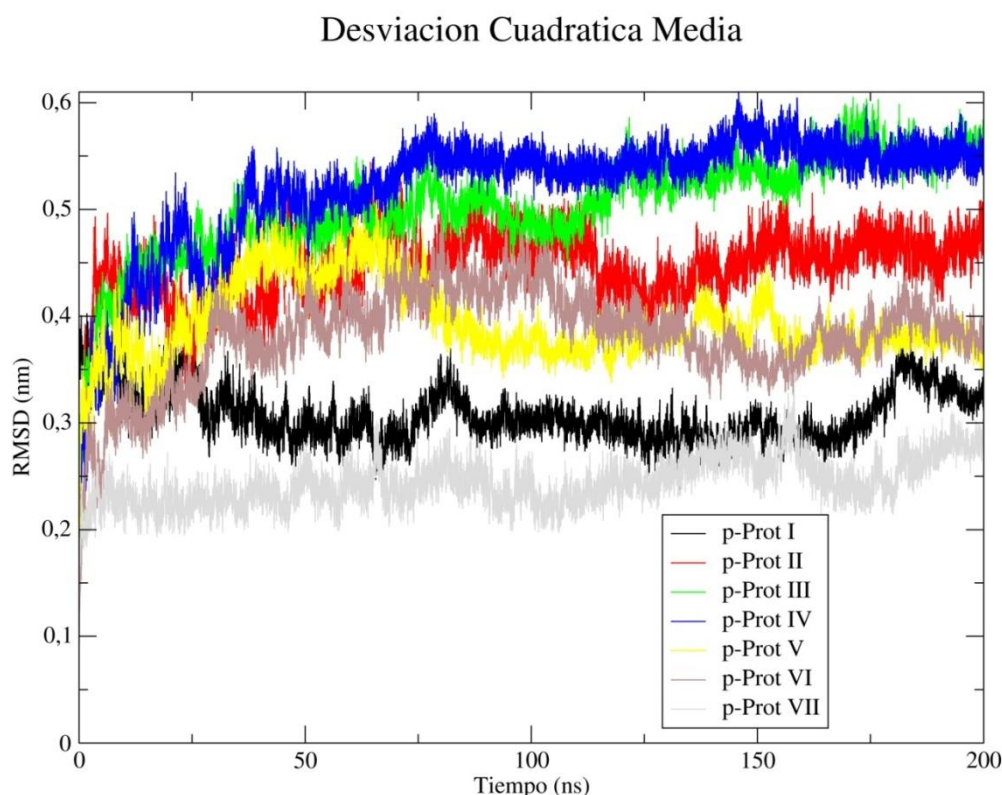


Figura 9. Evolución de la desviación cuadrática media (RMSD) de las proteínas. El RMSD está calculado para el *backbone* de cada p-Prot con respecto a la estructura inicial de la DM.

De esta manera se puede ver que las distintas estructuras se encuentran estabilizadas en el sistema y que no perderán su estructura. Por lo tanto, podemos decir que las distintas sustituciones aminoacídicas encontradas, y su combinación en los diferentes haplotipos, no generan una desestabilización que derive en la pérdida de la estructura proteica. Esto se encuentra en consonancia con la función de detoxificación que cumple la GSTP1 en las células, catalizando la unión del GSH a radicales libres, oxidantes y compuestos xenobióticos para facilitar su eliminación. Es decir que, al no poseer especificidad para el segundo sustrato de la reacción, es esperable que la proteína tenga suficiente plasticidad para adaptarse a moléculas de distinto tamaño y con grupos funcionales variables. Esto implicaría que la región N-terminal (donde se encuentra el sitio

activo) tenga suficiente movilidad y/o que la composición aminoacídica pueda variar, para contar con residuos con diferentes propiedades fisicoquímicas que puedan adaptarse a los diferentes sustratos.

Continuando con el análisis de la estabilidad de las estructuras, también se analizó la evolución del tamaño que adquieren las proteínas durante la fase de producción, a través de la determinación del área superficial accesible al solvente. Este parámetro brinda una medida del grado de compactación de las estructuras, y al analizar su evolución se puede observar la conservación del plegamiento de las proteínas. En la **Figura 10** se puede ver que la superficie accesible al solvente parte de distintos valores para cada estructura, pero evoluciona hacia valores similares y constantes para todas las p-Prot, en torno a los 110-120 nm². Nuevamente estos resultados indican que se trata de proteínas estables, y en consecuencia de sustituciones que no generan una desestabilización de la estructura.

Otra forma de estimar el tamaño de las proteínas y su estabilidad en el tiempo es a través de la evolución del radio de giro, que da una medida de qué tan expandida está la estructura en el espacio con respecto a su centro de masa; un radio de giro más elevado indica una estructura más abierta, mientras que un radio de giro más bajo indica una estructura más compacta. En la **Figura 11** se observa que las p-Prot I y VI presentan un radio de giro cercano a 1,65 nm, menor al resto de las estructuras con un radio de giro en torno a 1,75 nm. Es decir, que las p-Prot I y VI evolucionan hacia una estructura más compacta que las demás, en consonancia con lo obtenido anteriormente para la superficie accesible al solvente, donde estas dos estructuras presentan los valores más bajos de área superficial, es decir mayor compactación. En el caso de p-Prot VI este resultado se condice con lo concluido anteriormente con respecto a la capacidad del nuevo residuo treonina de formar nuevas interacciones con residuos cercanos (**Figura 6**), restringiendo la movilidad de la proteína. Por el contrario, las estructuras p-Prot II, III, IV, V y VII con radio de giro mayor tendrían estructuras menos compactas. Particularmente, este resultado de la p-Prot III coincide con lo concluido anteriormente con respecto a las sustituciones aminoacídicas que

presenta esta estructura, que le darían mayor movilidad al *loop* en el que se encuentran ubicadas, y daría en consecuencia una estructura menos compacta.

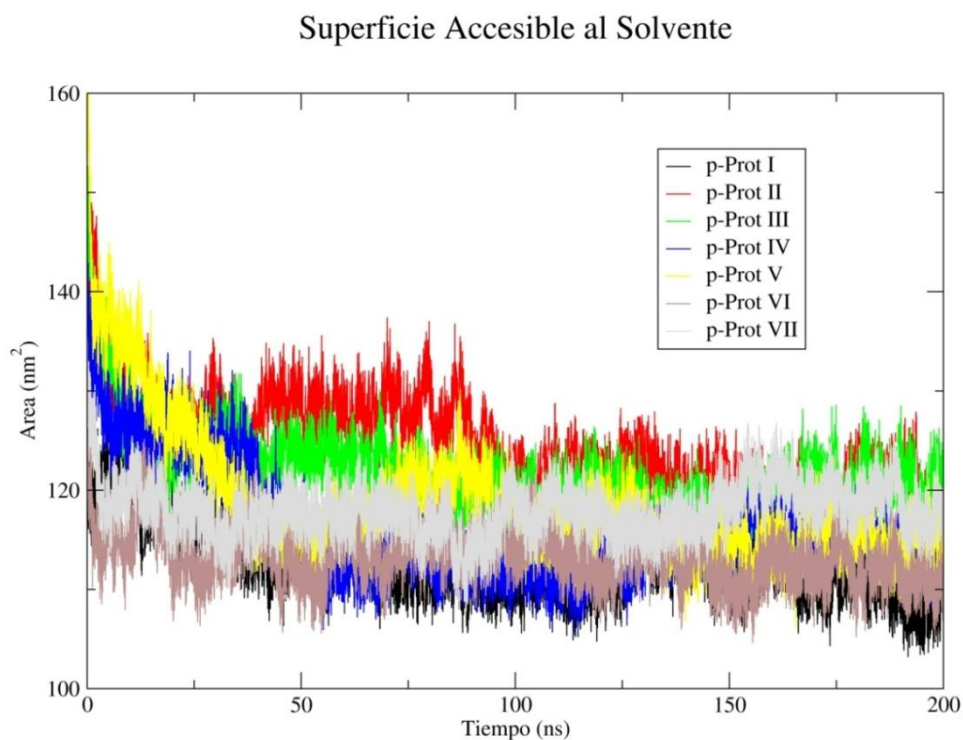


Figura 10. Evolución de la superficie accesible al solvente de las proteínas.

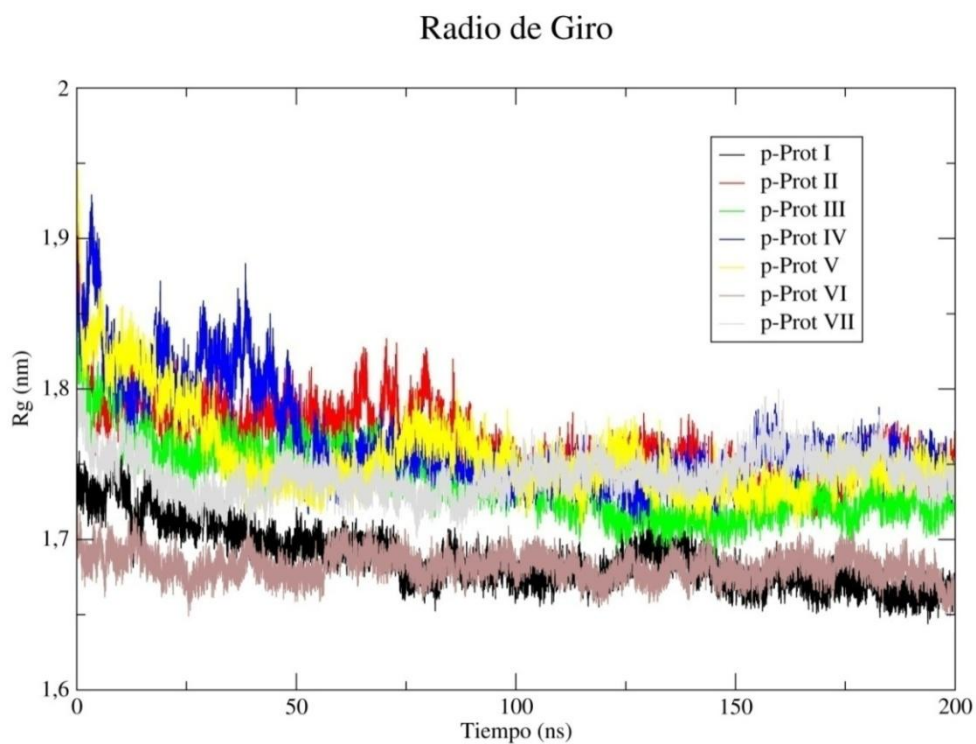


Figura 11. Evolución del radio de giro de las proteínas.

Otro factor que puede analizarse para estudiar la flexibilidad y movilidad de las estructuras es la fluctuación del RMSD (RMSF) de cada átomo a lo largo de la DM. En este caso calculamos el RMSF de los átomos de C alfa para tener una idea del grado de movilidad de cada residuo aminoacídico en particular y de la flexibilidad de cada región de la estructura. Como es de esperar, los extremos N- y C-terminal tienen una elevada movilidad al estar libres y contar con menos restricciones (**Figura 12**). Además, puede verse que, de manera general, todas las estructuras siguen a grandes rasgos el mismo patrón de movilidad en las distintas regiones de la cadena. Sin embargo, si se comparan cada una de las p-Prot individualmente con la estructura correspondiente al consenso (p-Prot I) se observan algunas diferencias, principalmente en la mitad N-terminal, donde se encontraron todas las sustituciones.

En el caso de p-Prot II se puede observar que la región en donde se encuentra la sustitución L70Q no muestra un cambio en su movilidad con respecto a la referencia, pero sí se observa un aumento en la fluctuación de la posición de los residuos 15 a 30 y un descenso de los residuos 30 a 50 (**Figura 13**). De esta manera, la sustitución de la leucina hidrofóbica por un residuo de mayor tamaño y polar orientado hacia el interior de la proteína ejerce un efecto estérico sobre la región adyacente en la estructura tridimensional, correspondiente a la primera hélice alfa (**Figura 5**), desplazándola de la posición que ocupaba y generando una estructura más abierta. Esto coincide con el aumento en el radio de giro y el área superficial observados. Podría suponerse que este mismo desplazamiento de la hélice α_1 tiene a su vez un efecto sobre el *loop* ubicado en la región adyacente, entre los residuos 30 a 50, generando el cambio observado en su movilidad.

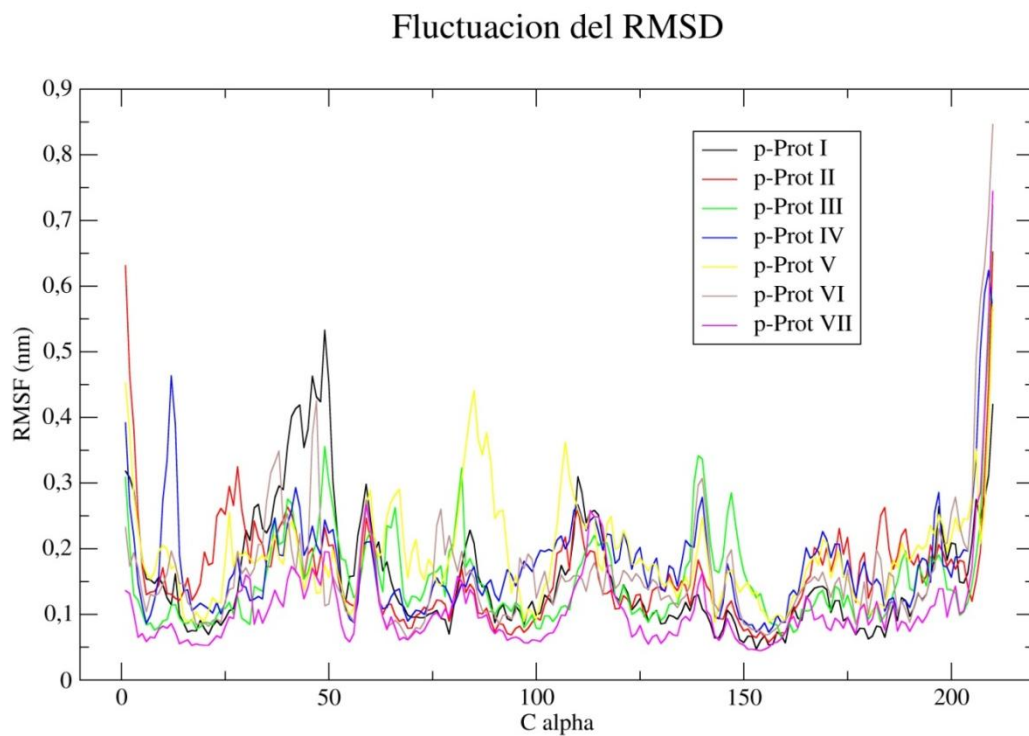


Figura 12. Fluctuaciones del RMSD (RMSF) de los C *alpha*.

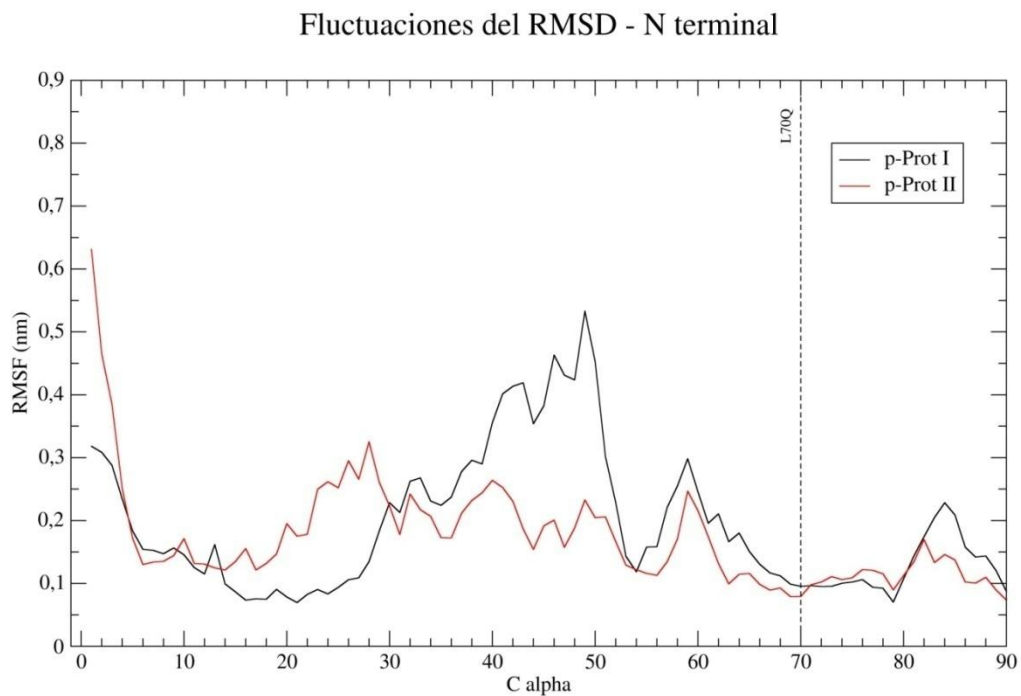


Figura 13. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y II.

La dinámica de la estructura priorizada en el análisis *in silico* p-Prot III, presentó todas las sustituciones aminoacídicas identificadas en el *loop* que conecta los segmentos $\beta 2$ y $\beta 3$ del plegamiento tioredoxina (**Figura 5**) y una movilidad inferior a la referencia (**Figura 14**), en contraposición a lo predicho en los análisis previos. Por un lado podemos mencionar que este *loop* tiene ciertas características de hélice alfa, y dado que la prolina en caso de ocurrir en este tipo de estructura secundaria lo hace en los extremos, para limitar el impedimento que genera (Fujiwara y col., 2012; Wang y Feng, 2003), y que en este caso la prolina se encuentra en la zona intermedia, por lo tanto al sustituirla por otro residuo se podría estar favoreciendo la estructura de hélice alfa, más estable y con menor movilidad. Adicionalmente, el nuevo residuo es un glutamina con la capacidad de estabilizar la hélice gracias a que puede formar nuevos puentes de hidrógeno con su cadena lateral (Roy y Dannenberg, 2011). También puede observarse que los residuos hidrofóbicos de las posiciones 34 y 44 quedan enfrentados (**Figura 7**), dando la posibilidad de un efecto hidrofóbico que le brinde estabilidad a la hélice. Finalmente, puede mencionarse que el nuevo residuo de glicina en la posición 48 se encuentra hacia el final de esta región, motivo por el cual, a pesar de ser un residuo que aportaría una mayor movilidad, no genera un efecto disruptivo en esta región.

En el caso de p-Prot IV se observa un descenso de la movilidad en la región donde ocurre la sustitución aminoacídica, junto con un gran aumento en torno a la posición 10 (**Figura 15**). Al analizar la estructura puede verse que ambas regiones son adyacentes en el espacio (**Figura 16**), de manera que al sustituir una valina por una fenilalanina, aún hidrofóbica pero de mayor tamaño, puede estar generándose un efecto estérico sobre las posiciones adyacentes que lleven al aumento observado de la movilidad. De manera similar, en la estructura p-Prot V puede verse un descenso de la movilidad en el segmento 30 a 50 y un aumento en los residuos 60 a 90 (**Figura 17**), que también puede explicarse por el efecto estérico que genera el nuevo residuo de triptofano, orientado hacia el interior de la proteína, sobre las regiones adyacentes en el plegamiento (**Figura 18**). Esto concuerda con un radio de giro mayor, indicando una estructura más abierta, como se vio anteriormente.

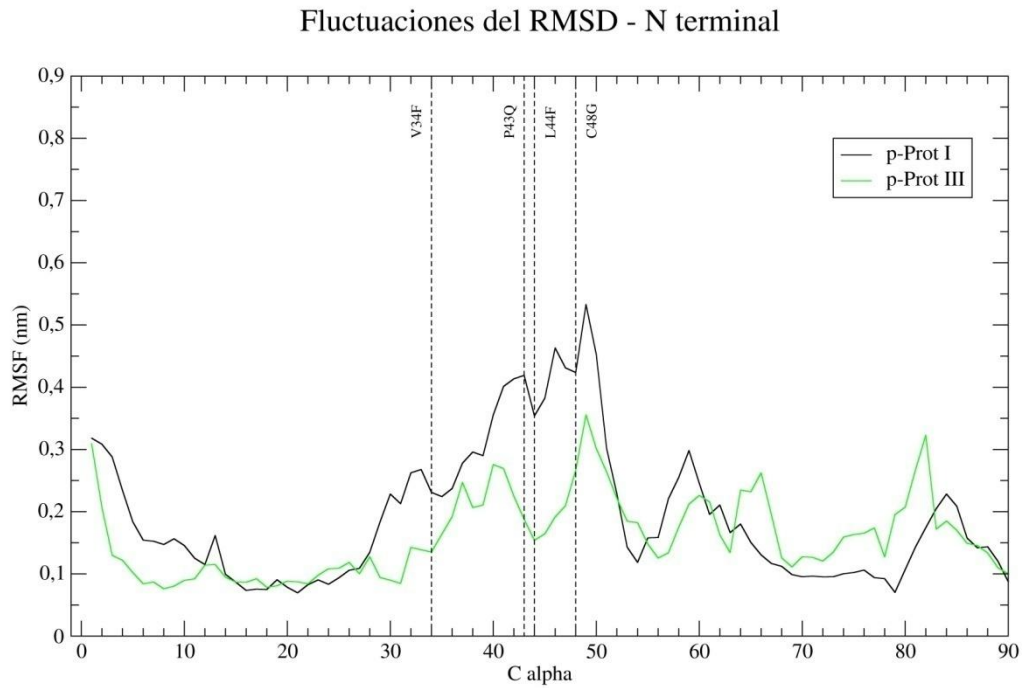


Figura 14. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y III.

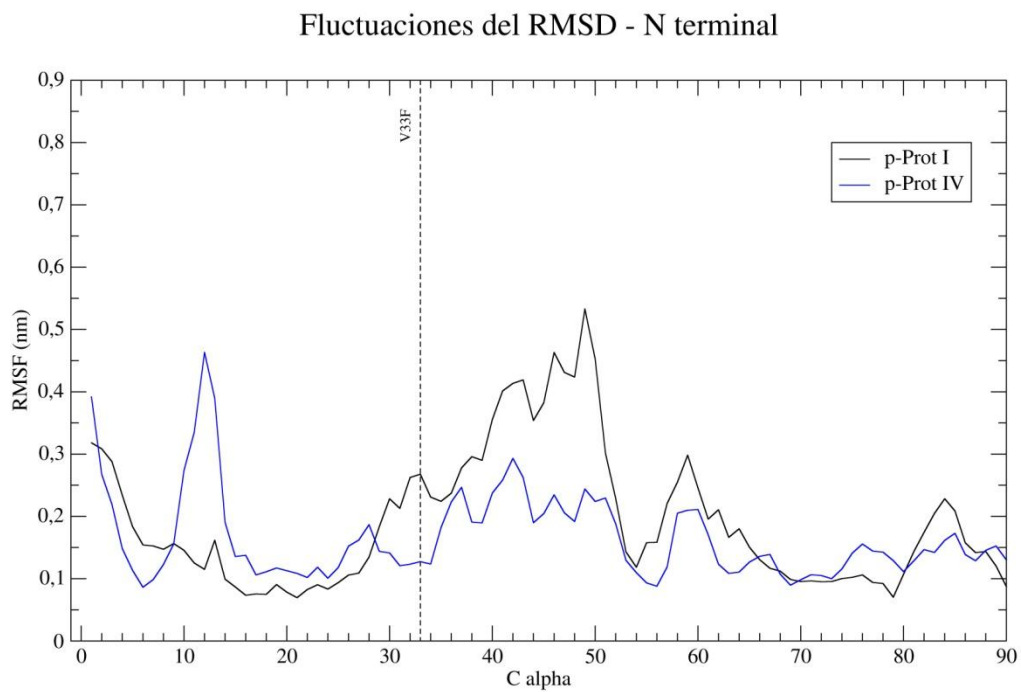


Figura 15. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y IV.

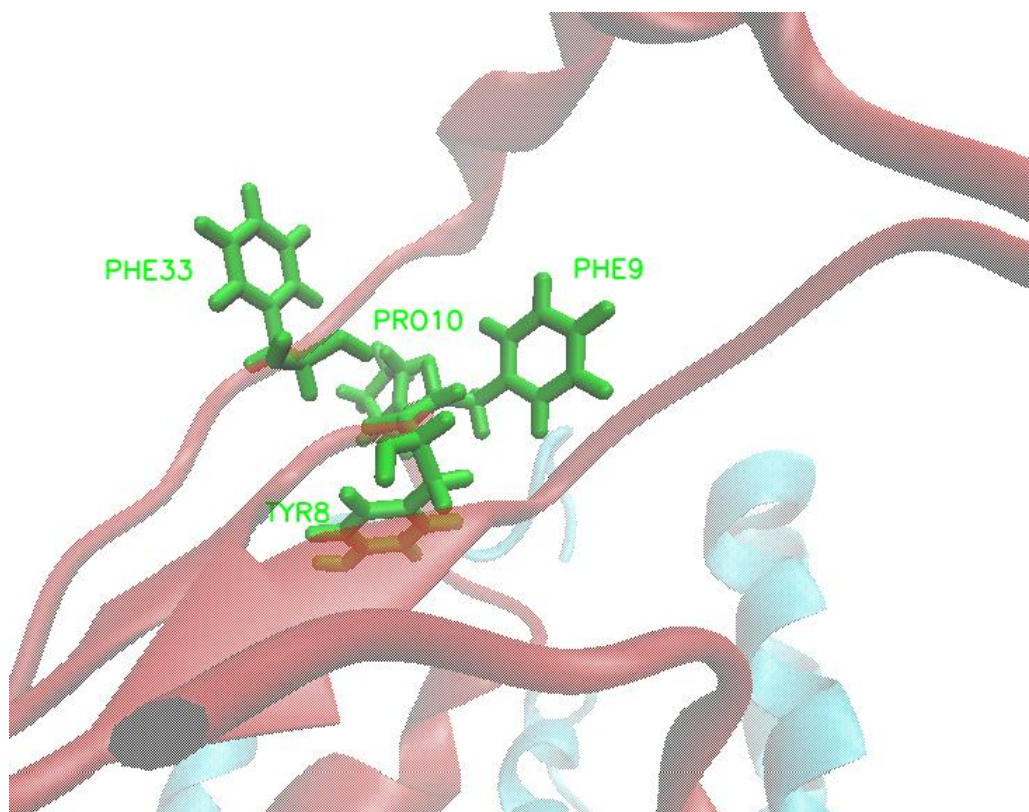


Figura 16. Acercamiento al nuevo residuo y los aminoácidos cercanos, en p-Prot IV.

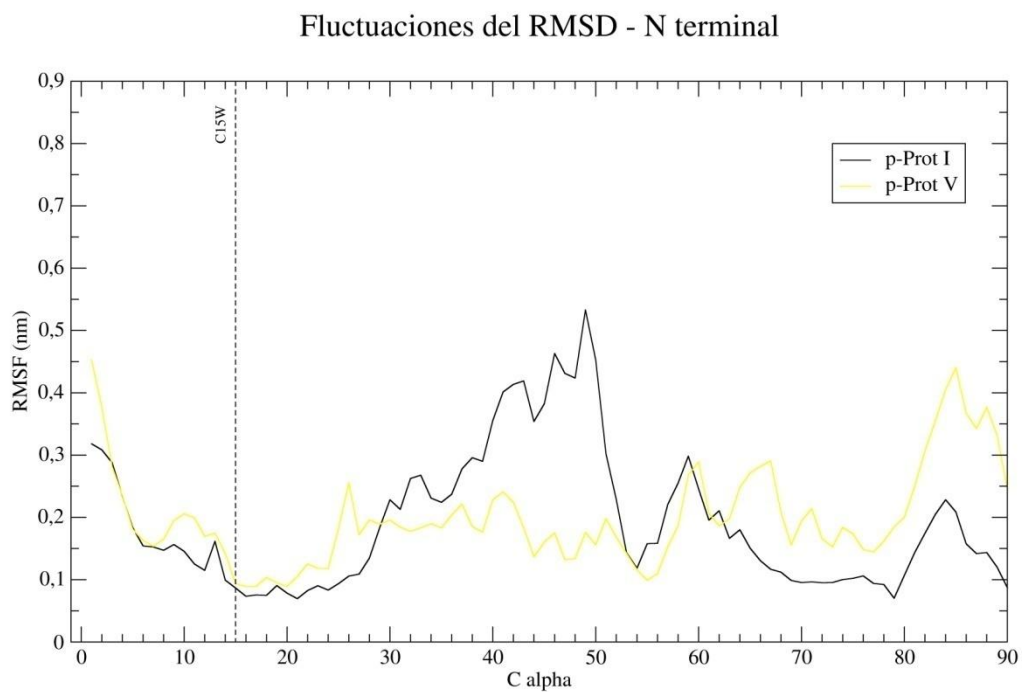


Figura 17. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y V.

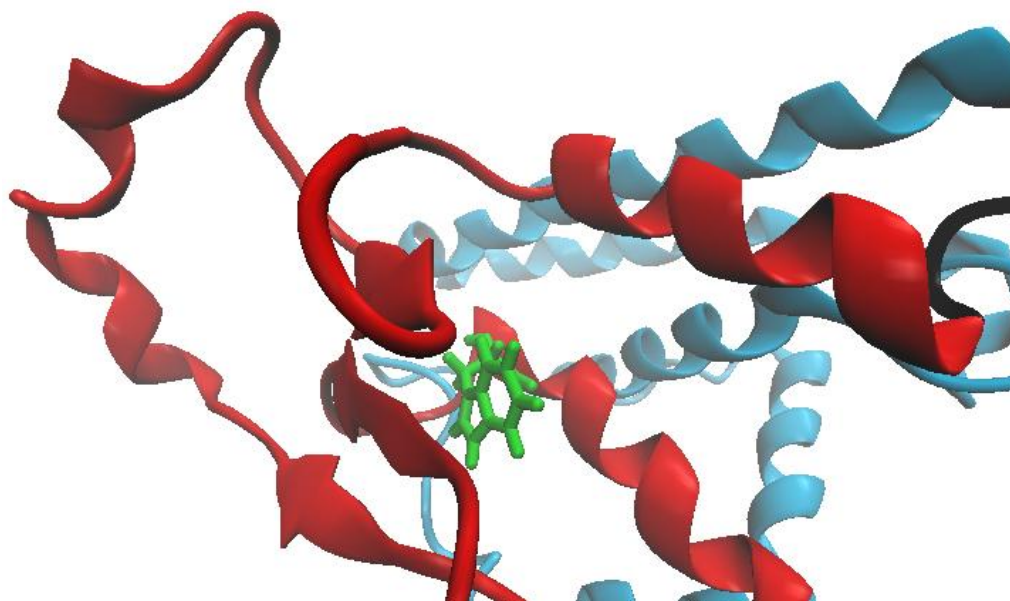


Figura 18. Estructura p-Prot V con el nuevo residuo de triptofano.

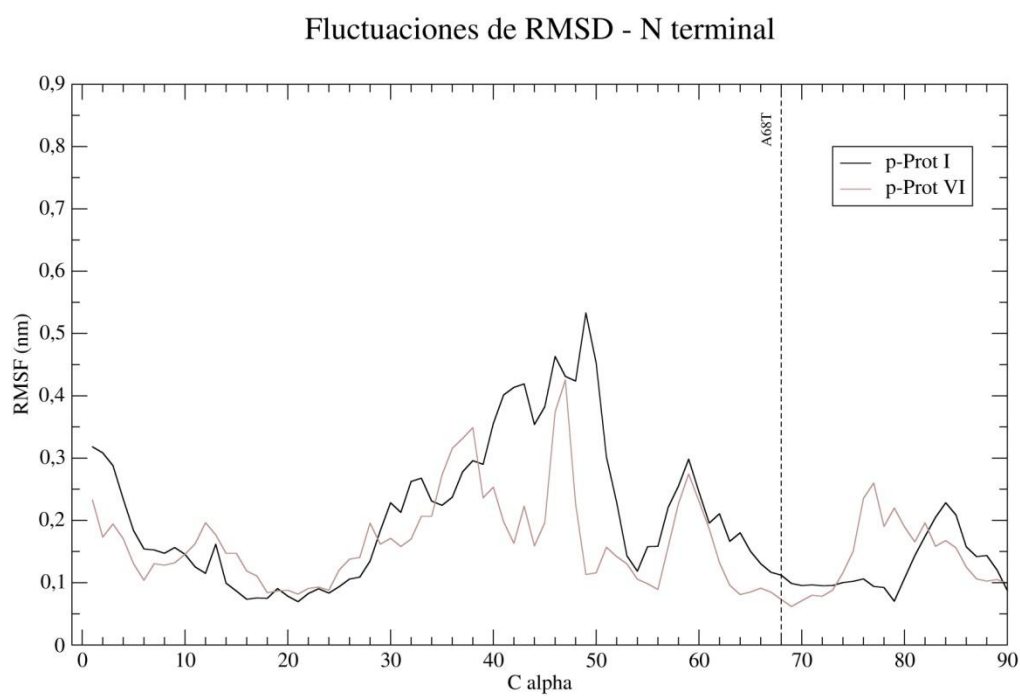


Figura 19. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y VI.

Con respecto a la estructura p-Prot VI, no se observan grandes diferencias en la movilidad, teniendo un patrón similar a la referencia (**Figura 19**). Esto puede deberse a que el residuo se encuentra en la superficie de la proteína, sin generar problemas estéricos en el interior de la estructura, obteniendo un grado de compactación similar al de p-Prot I, como puede verse en los resultados obtenidos para el radio de giro y la superficie accesible al solvente.

Finalmente, otra de las estructuras priorizadas en el análisis *in silico* inicial, p-Prot VII, con múltiples sustituciones, presentó de manera general una menor movilidad del dominio N-terminal (**Figura 20**). Particularmente, el mayor descenso de movilidad ocurre en el *loop* entre los residuos 30 a 50, y se da por la estabilización que genera la sustitución P43Q, como ya fue explicado anteriormente para la p-Prot III.

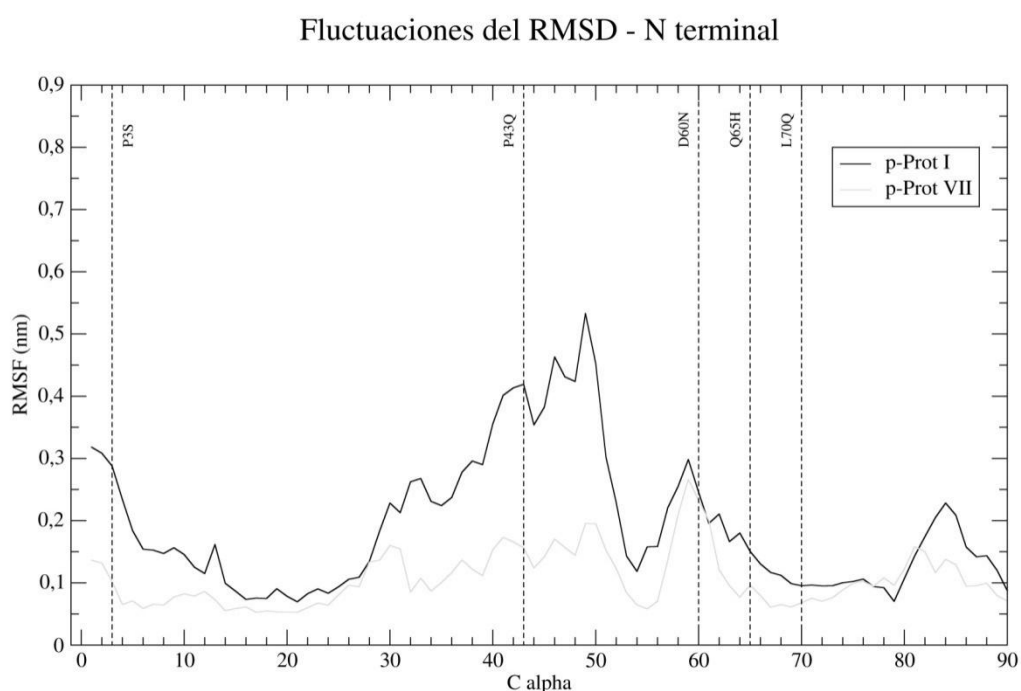


Figura 20. Comparación del RMSF de las estructuras p-Prot I y VII.

3.3 Lactato Deshidrogenasa A

3.3.1 Re-secuenciación

Como se mencionó previamente, el análisis de los genes candidatos estudiados en las bases de datos de variantes mostró un elevado número de posiciones polimórficas, ubicadas incluso en regiones codificantes. Sin embargo, y contrariamente a lo observado para el gen GSTP1, la re-secuenciación y alineamiento del gen LDHA resultó en la identificación de un total de 37 SNPs, ubicados exclusivamente en regiones no codificantes, de los cuales 33 se encontraron en los intrones y 4 en la región promotora. En este caso la tasa de mutación resultante de un SNP cada 143 pb se encuentra en consonancia con la aproximación de un SNP cada 100 pb del Proyecto 1000 Genomas Bovinos (*1000 Bulls Genome Project*; www.1000bullgenomes.com).

Como se analizó anteriormente, la enzima GSTP1 cataliza una reacción entre el sustrato específico GSH y un segundo sustrato inespecífico, además de cumplir funciones no enzimáticas de regulación. De esta manera resulta esperable que esta proteína cuente con algún grado de diversidad de secuencia que le otorgue suficiente plasticidad para interaccionar en su sitio activo con sustratos de formas, tamaños y propiedades fisicoquímicas variados. Por el contrario, y siguiendo esta misma lógica, la nula variabilidad de secuencia obtenida para la enzima LDHA en este trabajo puede explicarse en su elevada especificidad, catalizando una reacción entre sustratos concretos (lactato y NAD⁺, o piruvato y NADH, dependiendo de la dirección de catálisis de la reacción).

En este mismo sentido, al comparar el gen LDHA de diferentes especies se observa una gran diversidad de secuencia, mientras que al analizar la secuencia primaria de la proteína codificada en cada caso se observa un elevado grado de conservación de los residuos aminoácidos (ver **Figura 22** en Anexos).

3.4 Estudio por Modelos de Ecuaciones Estructurales

La metodología de Modelos de Ecuaciones Estructurales (SEM) es adecuada para analizar la causalidad entre las diferentes variables fenotípicas y lograr construir una red que explique los efectos entre las mismas. Como ya se describió, el estudio por re-secuenciación del gen LDHA no presentó variantes estructurales de la enzima codificada, lo cual no permitió un análisis similar al realizado para el gen GSTP1. Sin embargo, se pudo contar con mediciones indirectas de la actividad de la enzima. Por otro lado, los individuos del Grupo G-II se encontraban fenotipificados en una amplia variedad de características relacionadas al crecimiento y la calidad de la carne, aunque el número de individuos totales no era lo suficientemente grande como para realizar un estudio de asociación clásico. Todo esto alentó a la búsqueda de modelos más adecuados para el análisis de estos datos, y finalmente se decidió utilizar la metodología SEM.

3.4.1 Datos fenotípicos del Grupo G-II

Entre las variables fenotípicas determinadas para los individuos del Grupo G-II se encuentran: parámetros colorimétricos (L^* , a^* y b^*) para la carne y la grasa, pH y temperatura post-faena, variables relativas a la composición lipídica (AGS, AGI, AGMI, AGPI, EET, PGI), al crecimiento (Pf, AOB, EGD), al estado redox celular (TBARS, PR) y a otros componentes de la carne (Fe, PC, PA). La **Tabla 10** muestra el valor medio y desviación estándar de las distintas variables en la población total. Como ya se mencionó en el Capítulo 2, parte de estas variables ya fueron motivo de análisis en otra Tesis Doctoral (Mutti, 2018), por lo cual este estudio buscó completar y profundizar ese análisis, y centrar la discusión en las variables no analizadas.

Tabla 10. Media y desviación estándar de las variables fenotípicas del grupo G-II estudiadas mediante SEM.

Variable	N	Media	Desviación Estándar	Variable	N	Media	Desviación Estándar
<i>Lc*</i>	36	37,54	± 3,15	<i>Lg*</i>	36	68,85	± 3,27
<i>ac*</i>	36	21,24	± 2,26	<i>ag*</i>	36	2,64	± 2,57
<i>bc*</i>	36	11,60	± 1,46	<i>bg*</i>	36	21,70	± 3,79
pH	36	6,5	± 0,15	T	36	32,43	± 2,96
AGS	36	41,93	± 2,51	AGI	36	57,28	± 2,46
AGMI	36	51,63	± 2,81	AGPI	36	5,65	± 1,87
EET	36	6,00	± 2,82	PGI	27	4,85	± 1,77
AOB	34	81,79	± 11,73	EGD	34	14,79	± 3,91
Pf	36	719,8	± 87,4	PA	36	61,69	± 5,14
Fe	36	25,62	± 5,89	PC	36	0,93	± 0,13
PR	33	-23,63	± 15,51	TBARS	36	139,73	± 56,18

T se expresa en °C; AGS, AGI, AGMI, AGPI, PGI, PA y PC son porcentajes; EET son gramos de grasa total en 100 gr de carne recuperada como extracto etéreo; AOB está expresado en cm² y EGD en mm; Pf en kg; Fe en ppm; PR es el descenso de absorbancia por consumo de NADH por segundo y por gramo de carne; TBARS es la concentración nM de MDA generada por gramo de carne.

La composición promedio obtenida en la población del grupo G-II para los componentes inorgánicos en general, y del hierro en particular, con valores de 0,93% y 25,62 ppm, respectivamente, son coincidentes con los reportados por Walshe y colaboradores (2006) y Cabrera y colaboradores (2010), respectivamente. Por otro lado, el valor obtenido para el contenido de agua de las muestras resultó inferior a lo reportado en múltiples publicaciones (Dixon y col., 2012; Mills y col., 1992), probablemente porque la determinación no se realizó sobre las muestras frescas, sino luego de haber sido congeladas para su preservación. Con respecto a la determinación de los productos de la

oxidación lipídica, se obtuvieron valores considerablemente mayores a los reportados por otros autores (Ladeira y col., 2014; Ponnampalam y col., 2001). Nuevamente, esto puede deberse a que estas determinaciones no se realizaron sobre las muestras frescas, motivo por el cual la peroxidación de los lípidos pudo haber continuado llegando a los valores medidos. Además, la presencia en el Grupo G-II de animales cruza con la raza Wagyu, conocida por tener un mayor contenido de grasa intramuscular, con mayores niveles de AGMI en comparación a otras razas (De Smet y col., 2004), podría también aportar a este aumento de los peróxidos lipídicos medidos.

3.4.2 Interacciones entre variables

Al analizar redes de causalidad entre variables, la utilización de SEM tiene la ventaja de permitir discriminar entre los efectos directos e indirectos, logrando obtener información de los mecanismos fisiológicos por los cuales interaccionan las variables, lo cual es muy difícil de detectar con modelos lineales estándares (Cha y col., 2017). De esta forma, luego de testear todos los posibles modelos compuestos por tríos de variables, se registraron todas las interacciones significativas ($p\text{-value} < 0,05$), y con todas aquellas que tuvieran sentido biológico se construyeron los esquemas de la **Figura 21**. Para facilitar el análisis, los esquemas están organizados alrededor de variables centrales relativas al color de la carne (ac^* , bc^* , Lc^* ; esquema I), al color de la grasa dorsal (ag^* , bg^* , Lg^* ; esquema II), a la composición lipídica de la carne (AGS, AGI, AGMI, AGPI; esquema III), y al crecimiento de la res (Pf; esquema IV). Sin embargo, puede verse que todas las variables podrían incorporarse en una única red que muestre todas las interacciones entre los distintos parámetros, evidenciando la complejidad del sistema biológico que determina, por ejemplo, el color de la carne.

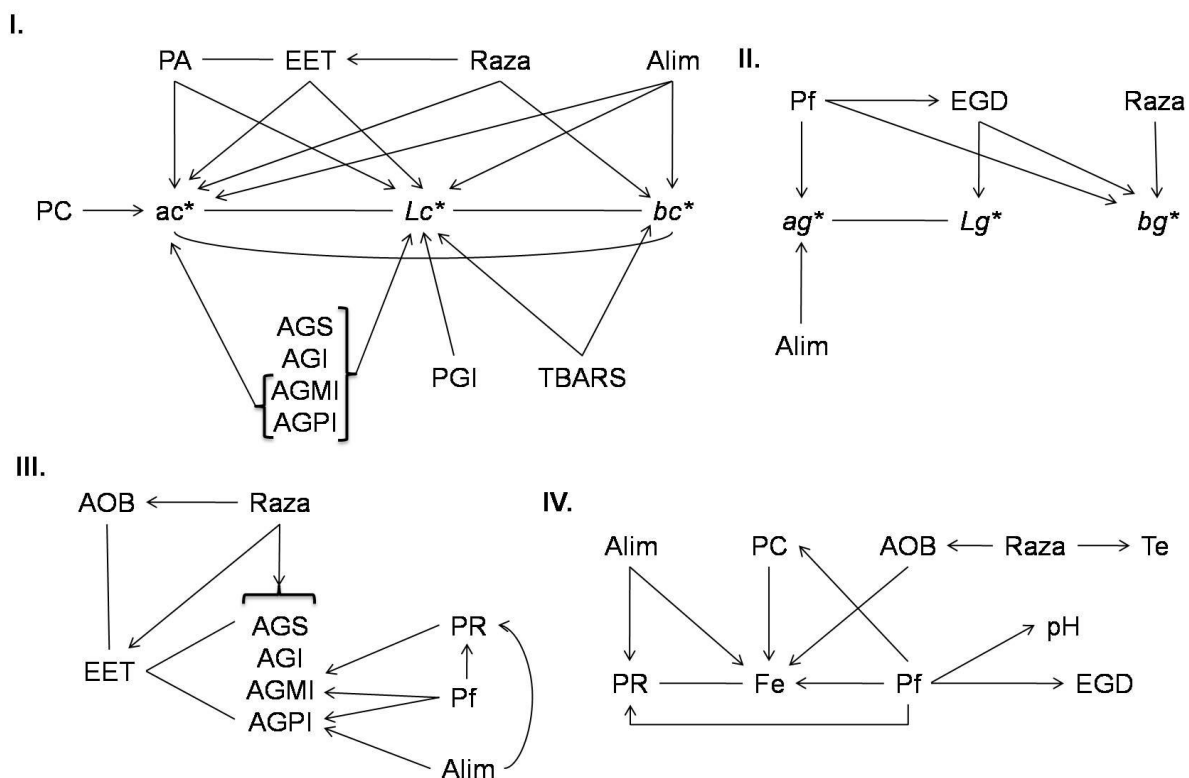


Figura 21. Esquemas representando la relación significativa entre variables fenotípicas obtenidas a partir de estudios de SEM. Las flechas indican direccionalidad del efecto de una variable sobre otra, mientras que las líneas indican interacciones pero sin una dirección específica. ac^* , bc^* , Lc^* son los parámetros CIELab de la carne; ag^* , bg^* , Lg^* son los parámetros CIELab de la grasa; AGS, AGI, AGMI y AGPI son los porcentajes de ácidos grasos saturados, insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados; PGI, porcentaje de grasa intramuscular; EET, extracto etéreo total; AOB, área de ojo de bife; EGD, espesor de grasa dorsal; PA, porcentaje de agua; PC, porcentaje de cenizas; Fe, composición de hierro; PR, poder reductor; TBARS, especies reactivas de ácido tiobarbitúrico; Pf, peso final; Te, temperatura; Alim, alimentación.

En los esquemas puede observarse que la raza de los animales y la alimentación que reciban influirán sobre los parámetros colorimétricos de la carne, la composición lipídica y el crecimiento, como es esperable y en concordancia con múltiples publicaciones revisadas en Mancini y Hunt (2005) y Przybylski y Hopkins (2015). Por su parte, la composición de agua de la carne (PA) varía como consecuencia de la desnaturalización y degradación proteica que ocurre *post mortem*, que lleva a la pérdida de volumen de la fibra muscular. De esta manera se ve afectada la reflexión y dispersión de la luz sobre la carne, y en

consecuencia el color que se percibirá (Hughes y col., 2014), lo que explica el efecto observado de PA sobre a_c^* (medida del color rojo) y L_c^* (medida de la luminosidad).

En el mismo sentido, los distintos factores relacionados a la composición lipídica (EET, AGS, AGI, AGMI, AGPI, PGI) ejercen un efecto sobre los parámetros colorimétricos como consecuencia principalmente del grado de oxidación lipídica (Ladeira y col., 2014; Mancini y Hunt, 2005). Así, teniendo en cuenta la estrecha relación entre estos dos procesos de oxidación, el ritmo de oxidación lipídica podría ser utilizado como un indicador del grado de susceptibilidad a la oxidación de los pigmentos de la carne (Ladeira y col., 2014). Adicionalmente, el efecto del contenido de la grasa intramuscular sobre el parámetro L_c^* coincide con lo reportado por Pflanzner y de Felício (2011). A su vez, la fracción lipídica se ve influenciada por el crecimiento del animal (Przybylski y Hopkins, 2015), siendo particularmente interesantes los ácidos grasos insaturados, que son más susceptibles a la peroxidación, y cuyos productos afectan la estabilidad de la Mb. En este sentido se puede ver que el crecimiento del animal ejercería un efecto indirecto sobre los parámetros colorimétricos a través de la composición lipídica del músculo. Por el contrario, la raza y la alimentación de los individuos ejercen tanto un efecto directo como indirecto en la determinación del color de la carne, esto ha sido bien documentado; como fue discutido en la Introducción de esta Tesis.

Con respecto a la composición de Fe de la carne vemos que se ve influenciada por el crecimiento y la alimentación del animal, con una interacción con el porcentaje de cenizas (PC, como medida de todos los componentes inorgánicos). A su vez se observa un efecto de la raza sobre la concentración de Fe a través del AOB, indicando que un cambio en la muscularidad del individuo (o en la tasa de crecimiento del músculo) podría determinar el contenido de hierro de la carne, y en consecuencia su color, coincidiendo con resultados de estudios comparativos entre especies de rumiantes (Giuffrida-Mendoza y col., 2007) y entre razas de bovinos con diferente conformación muscular (Cabrera y col., 2010; Pilarczyk, 2014; Somogyi y col., 2015). En este análisis no se observó una influencia directa del Fe sobre los parámetros colorimétricos, como hubiera sido esperable por el rol que cumple en

la función de la Mb, y los equilibrios redox en los que participa, como ya fue analizado en la Introducción. Sin embargo, el hierro también participa en la generación de un ambiente oxidativo dentro de la célula, al catalizar la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton (Blokhina, 2003), explicando el efecto que se observa del Fe sobre PR.

También puede verse el efecto de la alimentación sobre PR, que se entiende por el aporte que hace el alimento en compuestos antioxidantes. De esta manera la alimentación tiene un efecto directo sobre la composición lipídica, pero también uno indirecto, al influir sobre la estabilidad redox que tendrá la carne, lo que afecta la estabilidad de los lípidos. A su vez, la oxidación de los lípidos, con una mayor susceptibilidad de los AGI (Wood y col., 2008) afectará el color de la carne, como ya se analizó. En este mismo sentido, TBARS es una medida del nivel de oxidación de los lípidos, lo que explica la interacción observada con *bc*.*

Con respecto a los parámetros colorimétricos de la grasa se observa la influencia directa de la raza y la alimentación de los animales como sería esperable, y del crecimiento que alcanzan. En particular, el efecto directo de la raza sobre *bg** podría estar indicando una deposición diferencial de carotenos en el tejido adiposo entre las diferentes razas, como ya fue informado por ejemplo en las razas lecheras (Dunne y col., 2009). Por otro lado, se observa un efecto del EGD sobre la luminosidad de la grasa dorsal, del cual podría hipotetizarse que a mayor crecimiento del animal, y mayor depósito de grasa, se tendrían adipocitos más llenos, con mayor contenido graso por unidad de tejido, influenciando los parámetros colorimétricos. También podría ocurrir que un mayor depósito graso generaría una dilución de otros compuestos liposolubles (como los carotenos) que influyeran el color de la grasa. Estas hipótesis deben ser estudiadas con mayor detalle para ser comprobadas.

Por último resulta importante destacar, en comparación con los resultados obtenidos por el Dr. Mutti (2018) en su Tesis, que el análisis de las variables fenotípicas del Grupo G-II utilizando la metodología SEM, además de indicar interacciones ya identificadas (como las correlaciones entre la raza y la dieta con la composición lipídica, y entre EET y AGS o AGPI), permitió observar interacciones no identificadas por métodos clásicos (como por

ejemplo el efecto de la dieta, la raza y la composición lipídica sobre los parámetros colorimétricos de la carne), así como diversos efectos indirectos entre las variables, que no surgen de los modelos clásicos como ya fue expuesto.

A modo de cierre y como perspectiva a futuro, podemos mencionar que queda en evidencia la necesidad de comenzar a aplicar enfoques de biología de sistemas (*systems biology*) que integren los múltiples niveles de información que pueden obtenerse hoy día (genómicos, transcriptómicos, proteómicos, metabolómicos, etc), sumando la valiosa información que pueden aportar los métodos bioinformáticos, y con la asistencia de modelos matemáticos como las SEM, para comprender con mayor profundidad características multigénicas reguladas a diversos niveles, como es el caso del color de la carne.

Capítulo 4

CONCLUSIONES

Los principales resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral, surgidos del estudio de asociación entre marcadores moleculares y parámetros colorimétricos de la carne bovina, la caracterización genética de genes candidatos por re-secuenciación, del análisis *in silico* de sustituciones aminoacídicas y del análisis de efectos causales entre variables fenotípicas, pueden resumirse en los siguientes puntos:

- El estudio de asociación exploratorio permitió identificar un posible efecto de los genotipos de los genes GSTP1 y LDHA sobre parámetros colorimétricos de la carne, en concordancia con el QTL para color de carne informado en el cromosoma BTA29.
- Los estudios de caracterización de la variabilidad genética de GSTP1 mediante re-secuenciación permitieron identificar una elevada presencia de polimorfismos distribuidos a lo largo del gen: de un total de 128 SNPs, 36 se encontraron en regiones codificantes, y de los cuales 15 se detectaron en los exones. Por el contrario, el gen LDHA presentó una variabilidad menor, con un total de 37 SNPs, ubicados casi en su totalidad en regiones no codificantes y tan solo 4 detectados en la región promotora.
- La reconstrucción de haplotipos de los SNPs detectados ubicados en los exones del gen GSTP1, y la predicción de la estructura primaria de la proteína derivó en la determinación de 7 estructuras diferentes con 11 posibles sustituciones aminoacídicas (nsSNPs), distribuidas en las diferentes razas bovinas analizadas.
- El estudio *in silico* con diversas herramientas de los diferentes nsSNPs de manera individual permitió analizar el posible efecto de las sustituciones aminoacídicas sobre la estructura y función de la proteína. Este análisis destacó las sustituciones C15W, C48G, D60N, Q65H, A68T Y L70Q. Por su parte, el análisis de las estructuras predichas, teniendo en cuenta todos los nsSNPs que las componen, destacó las estructuras III, VI y VII, de las razas Criollo, Angus y Brahman, respectivamente. Tanto las sustituciones individuales como las estructuras proteicas destacadas deberían ser estudiadas prioritariamente en futuros ensayos *in vitro*.

➤ El estudio por dinámica molecular permitió comprender con mayor detalle a nivel atómico el efecto de las sustituciones aminoacídicas detectadas. Estos resultados permitirán planificar ensayos experimentales para su validación.

➤ Los modelos de ecuaciones estructurales (SEM) permitieron la obtención de una red de efectos causales entre variables fenotípicas que aporta información sobre el sistema biológico que determina el color de la carne, indicando tanto los efectos directos como indirectos entre las variables. Adicionalmente, este estudio permitió obtener relaciones entre variables que no habían podido ser determinadas por modelos tradicionales., evidenciando el valor del análisis a través de SEM.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., y Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., y Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
- Aldai, N., Murray, B.E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D.J., Osoro, K., y Nájera, A.I. (2006). The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physico-chemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Sci.* 72, 486–495.
- Ålin, P., Danielson, U.H., y Mannervik, B. (1985). 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett.* 179, 267–270.
- Andersson-Eklund, L., Danell, B., y Rendel, J. (1990). Associations between blood groups, blood protein polymorphisms and breeding values for production traits in Swedish Red and White Dairy bulls. *Anim. Genet.* 21, 361–376.
- AOAC (2000). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
- Armstrong, D., y Browne, R. (1994). *The Analysis of Free Radicals, Lipid Peroxides, Antioxidant Enzymes and Compounds Related to Oxidative Stress as Applied to the Clinical Chemistry Laboratory.* (Springer, Boston, MA), pp. 43–58.
- Arruda, M.P., Lipka, A.E., Brown, P.J., Krill, A.M., Thurber, C., Brown-Guedira, G., Dong, Y., Foresman, B.J., y Kolb, F.L. (2016). Comparing genomic selection and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.* 36.
- Van Ba, H., y Inho, H. (2013). Significant role of μ -calpain (CANP1) in proliferation/survival of bovine skeletal muscle satellite cells. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 49, 785–797.
- Barendse, W., Armitage, S.M., Kossarek, L.M., Shalom, A., Kirkpatrick, B.W., Ryan, A.M., Clayton, D., Li, L., Neibergs, H.L., Zhang, N., y col. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.* 6, 227–235.
- Barrett, J., Fry, B., Maller, J., y Daly, M. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
- Behrends, J.M., Mikel, W.B., Armstrong, C.L., y Newman, M.C. (2003). Color stability of semitendinosus, semimembranosus, and biceps femoris steaks packaged in a high-oxygen modified atmosphere. *J. Anim. Sci.* 81, 2230–2238.
- Bekhit, A.E.D., y Faustman, C. (2005). Metmyoglobin reducing activity. *Meat Sci.* 71, 407–439.
- Bekhit, A.E.D., Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D., y Bickerstaffe, R. (2003). The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chem.* 81, 175–187.
- Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Caccuri, A.M., Lorenzo, S., Parker, M.W., Rossjohn, J., McKinsty, W.J., Mozzi, A.F., Federici, G., Polizio, F., y col. (2001). Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers: a new role for an old enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 42138–42145.
- Belskie, K.M., Van Buiten, C.B., Ramanathan, R., y Mancini, R.A. (2015). Reverse electron transport effects on NADH formation and metmyoglobin reduction. *Meat Sci.* 105, 89–92.
- Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300.
- Berendsen, H.J.C., Grigera, J.R., y Straatsma, T.P. (1987). The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* 91, 6269–6271.
- Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D., y van Druenen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* 91, 43–56.
- Bjelanovic, M., Egelanddal, B., Phung, V.T., Langsrud, Sørheim, O., Hunt, M., y Slinde, E. (2016). Effects of metabolic substrates on myoglobin redox forms in packaged ground beef. *Food Packag. Shelf Life* 8, 24–32.
- Blokhina, O. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Ann. Bot.* 91, 179–194.

- Boles, J.A., Bowman, J.G., Surber, L.M.M., y Boss, D.L. (2004). Effects of barley variety fed to steers on carcass characteristics and color of meat. *J. Anim. Sci.* 82, 2087–2091.
- Bussi, G., Donadio, D., y Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126.
- Cabrera, M.C., Ramos, A., Saadoun, A., y Brito, G. (2010). Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Sci.* 84, 518–528.
- Capriotti, E., Fariselli, P., y Casadio, R. (2005). I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* 33, W306–W310.
- Castro, S., Ríos, M., Ortiz, Y., Manrique, C., Jiménez, A., y Ariza, F. (2016). Association of single nucleotide polymorphisms in CAPN1, CAST and MB genes with meat color of Brahman and crossbreed cattle. *Meat Sci.* 117, 44–49.
- Cha, E., Sanderson, M., Renter, D., Jager, A., Cernicchiaro, N., y Bello, N.M. (2017). Implementing structural equation models to observational data from feedlot production systems. *Prev. Vet. Med.* 147, 163–171.
- Chambaz, A., Scheeder, M.R.L., Kreuzer, M., y Dufey, P.-A. (2003). Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Sci.* 63, 491–500.
- Chan, W.K., Faustman, C., Velasquez-Pereira, J., McDowell, L.R., y Batra, T.R. (1998). Effects of alpha-tocopherol on metmyoglobin formation and reduction in beef from cattle fed soybean or cottonseed meal diets. *J. Anim. Sci.* 76, 1421.
- Chan, W.K.M., Faustman, C., y Decker, E. (1997). Oxymyoglobin Oxidation as Affected by Oxidation Products of Phosphatidylcholine Liposomes. *J. Food Sci.* 62, 709–712.
- Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., y Chan, A.P. (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One* 7, e46688.
- CIE (International Commission on Illumination) (2004). Colorimetry Technical Report.
- Crouse, J.D., Cundiff, L. V., Koch, R.M., Koohmaraie, M., y Seideman, S.C. (1989). Comparisons of and Inheritance for Carcass Beef Characteristics and Meat Palatability. *J. Anim. Sci.* 67, 2661.
- Dekkers, J.C.M. (2004). Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 *E-Suppl*, E313-328.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3217–3266.
- Dixon, C.L., Woerner, D.R., Tokach, R.J., Chapman, P.L., Engle, T.E., Tatum, J.D., y Belk, K.E. (2012). Quantifying the aging response and nutrient composition for muscles of the beef round. *J. Anim. Sci.* 90, 996–1007.
- Doff, G., Glowatzki, M.-L., y Gaillard, C. (1991). Searching for genetic markers for hereditary diseases in cattle by means of DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12, 109–112.
- Dror, R.O., Dirks, R.M., Grossman, J.P., Xu, H., y Shaw, D.E. (2012). Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annu. Rev. Biophys.* 41, 429–452.
- Dunne, P.G., O'Mara, F.P., Monahan, F.J., y Moloney, A.P. (2006). Changes in colour characteristics and pigmentation of subcutaneous adipose tissue and M. longissimus dorsi of heifers fed grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Sci.* 74, 231–241.
- Dunne, P.G., Monahan, F.J., O'Mara, F.P., y Moloney, a P. (2009). Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat Sci.* 81, 28–45.
- Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sander, C., y Scharf, M. (1995). The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *J. Comput. Chem.* 16, 273–284.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., y Pedersen, L.G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103, 8577–8593.

- Excoffier, L., y Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., y Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* 64, 171–181.
- Faustman, C., y Cassens, R.G. (1991). The effect of cattle breed and muscle type on discoloration and various biochemical parameters in fresh beef. *J. Anim. Sci.* 69, 184.
- Faustman, C., y Suman, S.P. (2017). The Eating Quality of Meat: I-Color. In *Lawrie's Meat Science*, (Elsevier), pp. 329–356.
- Faustman, C., Chan, W.K., Schaefer, D.M., y Havens, A. (1998). Beef color update: the role for vitamin E. *J. Anim. Sci.* 76, 1019.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., y Suman, S.P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. *Meat Sci.* 86, 86–94.
- Faustman, C., y Cassens, R.G. (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *J. Muscle Foods* 1, 217–243.
- Field, D., Sansone, S.-A., Collis, A., Booth, T., Dukes, P., Gregurick, S.K., Kennedy, K., Kolar, P., Kolker, E., Maxon, M., y col. (2009). 'Omics Data Sharing. *Science* (80-.). 326, 234–236.
- Folch, J., Lees, M., y Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- French, P., Stanton, C., Lawless, F., O'Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., y Moloney, A.P. (2000). Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci.*
- Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169.
- Fujiwara, K., Toda, H., y Ikeguchi, M. (2012). Dependence of alpha-helical and beta-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Struct. Biol.* 12, 18.
- Gardner, G.E., McGilchrist, P., y Pethick, D.W. (2014). Ruminant glycogen metabolism. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1575.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H., y Renerre, M. (2005). Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Sci.* 69, 175–186.
- Gelfi, C., De Palma, S., Ripamonti, M., Eberni, I., Wait, R., Bajracharya, A., Marconi, C., Schneider, A., Hoppeler, H., y Cerretelli, P. (2004). New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach. *FASEB J.* 18, 612–614.
- Georges, M., Dietz, A.B., Mishra, A., Nielsen, D., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Leipold, H., y Womack, J.E. (1993). Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1058–1062.
- Giovambattista, G., Ripoli, M. V., Lirón, J.P., Villegas Castagnasso, E.E., Peral-García, P., y Lojo, M.M. (2001). DNA typing in a cattle stealing case. *J. Forensic Sci.* 46, 1484–1486.
- Giuffrida-Mendoza, M., Arenas de Moreno, L., Uzcátegui-Bracho, S., Rincón-Villalobos, G., y Huerta-Leidenz, N. (2007). Mineral content of longissimus dorsi thoracis from water buffalo and Zebu-influenced cattle at four comparative ages. *Meat Sci.* 75, 487–493.
- Graffy, E.A., y Foran, D.R. (2005). A simplified method for mitochondrial DNA extraction from head hair shafts. *J. Forensic Sci.* 50, 1119–1122.
- Grigera Naón, J.J., Schor, A., Cossu, M.E., Cervini, M.L., y Colombatto, D. (2007). Relationship between short term energy supplementation and meat quality of steers in Argentina.
- Guerrero, A., Campo, M. del M., Olleta, J.L., y Sañudo, C. (2018). Carcass and Meat Quality in Goat. In *Goat Science*, (InTech), p.
- Guex, N., y Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative

protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723.

Guillén-Sans, R., y Guzmán-Chozas, M. (1998). The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 315–350.

Henderson, C.R., y Quaas, R.L. (1976). Multiple Trait Evaluation Using Relatives' Records. *J. Anim. Sci.* 43, 1188–1197.

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., y Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18, 1463–1472.

Hospital, A., Goñi, J.R., Orozco, M., y Gelpi, J.L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* 8, 37.

Huff Lonergan, E., Zhang, W., y Lonergan, S.M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.* 86, 184–195.

Hughes, J.M., Oiseth, S.K., Purslow, P.P., y Warner, R.D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Sci.* 98, 520–532.

Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38.

Hunter, R., y Harold, R. (1987). *The measurement of appearance* (New York, USA: John Wiley & Sons).

Immonen, K., Ruusunen, M., Hissa, K., y Puolanne, E. (2000). Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. *Meat Sci.* 55, 25–31.

Inoue, K., Valente, B.D., Shoji, N., Honda, T., Oyama, K., y Rosa, G.J.M. (2016). Inferring phenotypic causal structures among meat quality traits and the application of a structural equation model in Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 94, 4133–4142.

Ioannidis, J.P.A., y Khoury, M.J. (2011). Improving validation practices in “omics” research. *Science* 334, 1230–1232.

Ishikawa, T., Esterbauers, H., y Sies, H. (1986). Role of Cardiac Glutathione Transferase and of the Glutathione S-Conjugate Export System in Biotransformation of 4-Hydroxynonenal in the Heart*.

Karplus, M., y McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* 9, 646–652.

Kim, Y.H., Hunt, M.C., Mancini, R.A., Seyfert, M., Loughin, T.M., Kropf, D.H., y Smith, J.S. (2006). Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7856–7862.

Kim, Y.H., Keeton, J.T., Smith, S.B., Berghman, L.R., y Savell, J.W. (2009). Role of lactate dehydrogenase in metmyoglobin reduction and color stability of different bovine muscles. *Meat Sci.* 83, 376–382.

Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.-W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S. V., y Gottesman, M.M. (2007). A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* (80-.). 315, 525–528.

Kirkpatrick, M., y Heckman, N. (1989). A quantitative genetic model for growth, shape, reaction norms, and other infinite-dimensional characters. *J. Math. Biol.* 27, 429–450.

Kline, R. (2015). *Principles and Practice of Structural Equation Modeling* (The Guilford Press).

Kuimelis, R.G., Livak, K.J., Mullah, B., y Andrus, A. (1997). Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 255–256.

Laborde, E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 17, 1373–1380.

Ladeira, M.M., Santarosa, L.C., Chizzotti, M.L., Ramos, E.M., Machado Neto, O.R., Oliveira, D.M., Carvalho, J.R.R., Lopes, L.S., y Ribeiro, J.S. (2014). Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. *Meat Sci.* 96, 597–605.

Ledward, D.A. (1985). Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. *Meat Sci.* 15, 149–171.

Li, N., y Stephens, M. (2003). Modeling Linkage Disequilibrium and Identifying Recombination Hotspots Using

Single-Nucleotide Polymorphism Data. *Genetics* 165, 2213–2233.

Maiorov, V.N., y Crippen, G.M. (1995). Size-independent comparison of protein three-dimensional structures. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 22, 273–283.

Mancini, R.A., y Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Sci.* 71, 100–121.

Mancini, R.A., y Ramanathan, R. (2008). Sodium lactate influences myoglobin redox stability in vitro. *Meat Sci.* 78, 529–532.

Marino, M.J. (2018). How often should we expect to be wrong? Statistical power, P values, and the expected prevalence of false discoveries. *Biochem. Pharmacol.* 151, 226–233.

Masoodi, T.A., Rao Talluri, V., Shaik, N.A., Al-Aama, J.Y., y Hasan, Q. (2012). Functional genomics based prioritization of potential nsSNPs in EPHX1, GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes for breast cancer susceptibility studies. *Genomics* 99, 330–339.

Mazzucco, J., Melucci, L., Villarreal, E., Mezzadra, C., Soria, L., Corva, P., Motter, M., Schor, A., y Miquel, M. (2010). Effect of ageing and μ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. *Meat Sci.* 86, 878–882.

McMillin, K.W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci.* 80, 43–65.

Mills, E.W., Comerford, J.W., Hollender, R., Harpster, H.W., House, B., y Henning, W.R. (1992). Meat composition and palatability of Holstein and beef steers as influenced by forage type and protein source. *J. Anim. Sci.* 70, 2446–2451.

Mohan, A., Hunt, M.C., Barstow, T.J., Houser, T.A., y Muthukrishnan, S. (2010). Effects of malate, lactate, and pyruvate on myoglobin redox stability in homogenates of three bovine muscles. *Meat Sci.* 86, 304–310.

Moyen, C., Goudenege, S., Poussard, S., Sassi, A.H., Brustis, J.J., y Cottin, P. (2004). Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 728–743.

Mrode, R.A. (2005). Linear models for the prediction of animal breeding values (CABI Pub).

Mueller, R.O., Hancock, G.R., y Hancock, G.R. (2018). Structural Equation Modeling. In *The Reviewer's Guide to Quantitative Methods in the Social Sciences*, (Second Edition. | New York : Routledge, 2019. | Revised edition of The reviewer's guide to quantitative methods in the social sciences, 2010.: Routledge), pp. 445–456.

Mutti, F.E. (2018). Incorporación de Lino en la Dieta de Bovinos y su Efecto Sobre la Calidad de la Carne y Performance Reproductiva. Universidad Nacional de La Plata.

Neethling, N.E., Suman, S.P., Sigge, G.O., Hoffman, L.C., y Hunt, M.C. (2017). Exogenous and Endogenous Factors Influencing Color of Fresh Meat from Ungulates. *Meat Muscle Biol.* 1, 253.

Nelson, D., y Cox, M. (2000). Glycolysis and the catabolism of hexoses. In *Lehninger's Principles of Biochemistry*, (New York, USA: Worth Publishers), pp. 527–566.

Ng, P.C., y Henikoff, S. (2001). Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Res.* 11, 863–874.

NRC, (National Research Council) (2000). Nutrient requirements of beef cattle (Washington D.C.: National Academy Press).

Otto, G., Roehe, R., Looft, H., Thoelking, L., Knap, P.W., Rothschild, M.F., Plastow, G.S., y Kalm, E. (2007). Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Sci.* 75, 185–195.

Ouali, A., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., y Sentandreu, M.A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* 74, 44–58.

Parrinello, M., y Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52, 7182–7190.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., y Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333, 19–39.

Pejaver, V., Urresti, J., Lugo-Martinez, J., Pagel, K.A., Lin, G.N., Nam, H.-J., Mort, M., Cooper, D.N., Sebat, J., Iakoucheva, L.M., y col. (2017). MutPred2: inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants.

BioRxiv 1–28.

Pethick, D.W., Cummins, L., Gardner, G.E., Jacobs, R.H., Knee, B.W., McDowell, M., McIntyre, B.L., Tudor, G., Walker, P.J., y Warner, R.D. (2000). The regulation of glycogen level in the muscle of ruminants by nutrition.

Pflanzner, S.B., y de Felício, P.E. (2011). Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from Nellore steers varying in maturity and fatness. *Meat Sci.*

Pighin, D., Pazos, A., Chamorro, V., Paschetta, F., Cunzolo, S., Godoy, F., Messina, V., Pordomingo, A., y Grigioni, G. (2016). A Contribution of Beef to Human Health: A Review of the Role of the Animal Production Systems. *ScientificWorldJournal*. 2016, 8681491.

Pilarczyk, R. (2014). Concentrations of Toxic and Nutritional Essential Elements in Meat from Different Beef Breeds Reared under Intensive Production Systems. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 36–44.

Pinto, L., Ferraz, J., Pedrosa, V., Eler, J., Meirelles, F., Bonin, M., Rezende, F., Carvalho, M., Cucco, D., y Silva, R. (2011). Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. *Genet. Mol. Res.* 10, 2057–2064.

Ponnampalam, E.N., Trout, G.R., Sinclair, A.J., Egan, A.R., y Leury, B.J. (2001). Comparison of the color stability and lipid oxidative stability of fresh and vacuum packaged lamb muscle containing elevated omega-3 and omega-6 fatty acid levels from dietary manipulation. *Meat Sci.* 58, 151–161.

Priolo, A., Micol, D., y Agabriel, J. (2001). Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review. *Anim. Res.* 50, 185–200.

Priya Doss, C.G., Chakraborty, C., Chen, L., y Zhu, H. (2014). Integrating In Silico Prediction Methods, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation to Predict the Impact of ALK Missense Mutations in Structural Perspective. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–14.

Przybylski, W., y Hopkins, D. (2015). *Meat Quality: Genetic and Environmental Factors* (London, UK: CRC Press Inc.).

Ramanathan, R., y Mancini, R.A. (2018). Role of Mitochondria in Beef Color: A Review. *Meat Muscle Biol.* 2, 309.

Ramanathan, R., Mancini, R.A., Suman, S.P., y Beach, C.M. (2014). Covalent Binding of 4-Hydroxy-2-nonenal to Lactate Dehydrogenase Decreases NADH Formation and Metmyoglobin Reducing Activity. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2112–2117.

Ramanathan, R., Nair, M.N., Hunt, M.C., y Suman, S.P. (2019). Mitochondrial functionality and beef colour: A review of recent research. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 49, 9.

Ramírez-Bello, J., y Jiménez-Morales, M. (2017). Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac. Med. Mex.* 153, 218–229.

Realini, C.E., Duckett, S.K., Brito, G.W., Dalla Rizza, M., y De Mattos, D. (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Sci.* 66, 567–577.

Reed, J.C., Doctor, K.S., y Godzik, A. (2004). The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci. STKE* 2004, re9.

Renerre, M., y Mazuel, J. (1985). Relations entre méthodes de mesures instrumentales et sensorielles de la couleur de la viande. *Sci. Aliments* 5, 541–557.

Rhee, M.-S., Ryu, Y.-C., y Kim, B.-C. (2006). Postmortem Metabolic Rate and Calpain System Activities on Beef Longissimus Tenderness Classifications. *Biotechnol. Biochem.* 70, 1166–1172.

Ripoll, G., Alcalde, M.J., Horcada, A., Campo, M.M., Sañudo, C., Teixeira, A., y Panea, B. (2012). Effect of slaughter weight and breed on instrumental and sensory meat quality of suckling kids. *Meat Sci.* 92, 62–70.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, 3–11.

Rosa, G.J., Valente, B.D., de los Campos, G., Wu, X.-L., Gianola, D., y Silva, M.A. (2011). Inferring causal phenotype networks using structural equation models. *Genet. Sel. Evol.* 43, 6.

Della Rosa, M., Papaleo Mazzucco, J., y Aello, M. (2017). Archivos de zootecnia. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Zootecnia).

- Rosseel, Y. (2012). lavaan : An R Package for Structural Equation Modeling. *J. Stat. Softw.* 48, 1–36.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–106.
- Roy, D., y Dannenberg, J.J. (2011). The effects of regularly spaced glutamine substitutions on alpha-helical peptide structures: A DFT/ONIOM study. *Chem. Phys. Lett.* 512, 255–257.
- RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>
- Schneider, M. V, y Orchard, S. (2011). Omics Technologies, Data and Bioinformatics Principles. In *Bioinformatics for Omics Data*, B. Mayer, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 3–30.
- Scollan, N., Hocquette, J.-F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I., y Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.* 74, 17–33.
- Seideman, S.C., Cross, H.R., Smith, G.C., y Durland, P.R. (1984). Factors Associated With Fresh Meat Color: A Review. *J. Food Qual.* 6, 211–237.
- Seyfert, M., Mancini, R.A., Hunt, M.C., Tang, J., Faustman, C., y Garcia, M. (2006). Color Stability, Reducing Activity, and Cytochrome c Oxidase Activity of Five Bovine Muscles.
- Shastri, B. (2009). SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), pp. 3–22.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., y Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shipley, B. (2016). *Cause and Correlation in Biology: A User's Guide to Path Analysis, Structural Equations and Causal Inference* (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Singh, P.K., y Mistry, K.N. (2016). A computational approach to determine susceptibility to cancer by evaluating the deleterious effect of nsSNP in XRCC1 gene on binding interaction of XRCC1 protein with ligase III. *Gene* 576, 141–149.
- Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R.R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K., y Sharma, A. (2014). Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers Genomic Med.* 6, 49–58.
- De Smet, S., Raes, K., y Demeyer, D. (2004). Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim. Res* 53, 81–98.
- Smith, G.C., Belk, K.E., Sofos, J.N., Tatum, J.D., y Williams, S.N. (2000). Economic implications of improved color stability in beef. In *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality.*, E.A. Decker, C. Faustman, y C.J. Lopez-Bote, eds. (New York, USA: John Wiley and Sons), pp. 397–426.
- Sobrino, B., Brión, M., y Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.* 154, 181–194.
- Somogyi, T., Holló, I., Csapó, J., Anton, I., y Holló, G. (2015). Mineral content of three several muscles from six cattle genotypes. *Acta Aliment.* 44, 51–59.
- Suman, S.P., y Joseph, P. (2014). CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF MEAT | Color and Pigment. In *Encyclopedia of Meat Sciences*, p.
- Suman, S.P., Faustman, C., Stamer, S.L., y Liebler, D.C. (2007). Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* 7, 628–640.
- Swan, J.E., y Boles, J.A. (2002). Processing characteristics of beef roasts made from high and normal pH bull inside rounds. *Meat Sci.* 62, 399–403.
- Tang, H., y Thomas, P.D. (2016). PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-

specific evolutionary preservation. *Bioinformatics* 32, 2230–2232.

Tang, J., Faustman, C., Lee, S., y Hoagland, T.A. (2003). Effect of glutathione on oxymyoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1691–1695.

Tang, J., Faustman, C., y Hoagland, T.A. (2004). Krzywicki Revisited: Equations for Spectrophotometric Determination of Myoglobin Redox Forms in Aqueous Meat Extracts. *J. Food Sci.* 69, C717–C720.

Thamsen, M., y Jakob, U. (2011). The redoxome: Proteomic analysis of cellular redox networks. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 113–119.

Troy, D.J., y Kerry, J.P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Sci.* 86, 214–226.

Turner, P. y Stambulchik, E. (2008). XMGrace. Grace Development Team. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR. URL <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>

VanRaden, P.M., Van Tassell, C.P., Wiggans, G.R., Sonstegard, T.S., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., y Schenkel, F.S. (2009). Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 92, 16–24.

Vasieva, O. (2011). The many faces of glutathione transferase pi. *Curr. Mol. Med.* 11, 129–139.

Venselaar, H., te Beek, T.A.H., Kuipers, R.K.P., Hekkelman, M.L., y Vriend, G. (2010). Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 11, 548.

Vestergaard, M., Oksbjerg, N., y Henckel, P. (2000). Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. *Meat Sci.* 54, 177–185.

Villarreal, E.L., Melucci, L.M., y Mezzadra, C.A. (2006). Genetic components for slaughter and meat quality traits in the Angus-Hereford crossing. *Proc. 8th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006* 13–17.

Walshe, B.E., Sheehan, E.M., Delahunty, C.M., Morrissey, P.A., y Kerry, J.P. (2006). Composition, sensory and shelf life stability analyses of Longissimus dorsi muscle from steers reared under organic and conventional production systems. *Meat Sci.* 73, 319–325.

Wang, J., y Feng, J.-A. (2003). Exploring the sequence patterns in the α -helices of proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 16, 799–807.

Wang, J., Cieplak, P., y Kollman, P.A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* 21, 1049–1074.

Wang, R.-S., Oldham, W.M., Maron, B.A., y Loscalzo, J. (2018). Systems Biology Approaches to Redox Metabolism in Stress and Disease States. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 953–972.

Warren, H.E., Scollan, N.D., Nute, G.R., Hughes, S.I., Wood, J.D., y Richardson, R.I. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. II: Meat stability and flavour. *Meat Sci.* 78, 270–278.

Weller, J. (2007). Current and Future Developments in Patents for Quantitative Trait Loci in Dairy Cattle. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 1, 69–76.

Wheeler, T.L., Cundiff, L. V., Shackelford, S.D., y Koohmaraie, M. (2005). Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): Carcass, yield, and longissimus palatability traits. *J. Anim. Sci.* 83, 196–207.

White, S., Casas, E., Wheeler, T., Shackelford, S., Koohmaraie, M., Riley, D., Chase, C., Johnson, D., Keele, J., y Smith, T. (2005). A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent¹. *J. Anim. Sci.* 83, 2001–2008.

Wong, P.C., Waggoner, D., Subramaniam, J.R., Tessarollo, L., Bartnikas, T.B., Culotta, V.C., Price, D.L., Rothstein, J., y Gitlin, J.D. (2000). Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2886–2891.

- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., y Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78, 343–358.
- Yang, A., Brewster, M., Lanari, M., y Tume, R.. (2002). Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat Sci.* 60, 35–40.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., y Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.
- Zhang, Y., Liu, W., Hopkins, D., Niu, L., Yang, X., Zhu, L., y Luo, X. (2018). Mitochondrial proteome changes of beef longissimus lumborum muscle during post-mortem storage.
- Zhao, Y., Mette, M.F., Gowda, M., Longin, C.F.H., y Reif, J.C. (2014). Bridging the gap between marker-assisted and genomic selection of heading time and plant height in hybrid wheat. *Heredity (Edinb.)* 112, 638–645.

ANEXOS

Ensayo de TBARS

Soluciones:

TCA 5%: 2,5 gr de ácido tricloroacético en 50 ml de agua bidestilada (en frasco oscuro)

TBA 0,67%: 0,1675 gr de TBA en 25 ml de agua bidestilada (en frasco oscuro)

Stock MDA (1 mM): 2,5 µl de malondialdehído 4,17 M en 10 ml de HCl 0,1 M (en frasco oscuro)

Stock 1 (S1, 0,01 mM): 100 µl de Stock MDA en 9,9 ml de TCA 5% (en frasco oscuro)

Stock 2 (S2, 0,001 mM): 1 ml de S1 en 9 ml de TCA 5% (en frasco oscuro)

Stock 3 (S3, 0,0001 mM): 1 ml de S2 en 9 ml de TCA 5% (en frasco oscuro)

Curva de Calibración:

TUBO		Stock (µl)		TCA 5% (µl)	TBA (µl)
MDA (nM)	N°				
0	Blanco (0)	-	-	150	50
5	1	S3	10	140	50
15	2	S3	20	130	50
20	3	S3	30	120	50
25	4	S3	50	100	50
50	5	S2	10	140	50
100	6	S2	20	130	50
150	7	S2	30	120	50
200	8	S2	40	110	50
250	9	S2	50	100	50
350	10	S2	70	80	50
500	11	S2	100	50	50
750	12	S1	15	135	50
1000	13	S1	20	130	50
1250	14	S1	25	125	50
1500	15	S1	30	120	50
2000	16	S1	40	110	50
Muestra			50	100	50

Colocar los reactivos en tubos de 200 µl y calentar a 100°C (aprox) por 20 minutos para llevar a cabo la reacción. A continuación centrifugar a 14.000 g por 2 minutos y cargar la placa con 80 µl del sobrenadante para realizar la medida de absorbancia.

Protocolos de amplificación y mezclas de reacción para PCR

GSTP1	E1-2	E3-4	E4	I4E5	E5I5	I5E6	E6-7
H ₂ O (μl)	27,8	30,8	27,8	27,8	29,8	27,8	23,8
Buffer 10X (μl)	5	5	5	5	5	5	5
dNTPs (μl)	4	4	4	4	4	4	4
Mg ⁺² (μl)	4	3	4	4	2	4	3
Primers (μl)	3	3	3	3	3	3	3
DMSO (μl)	2	-	-	-	-	-	2
Taq (μl)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
ADN (μl)	4	4	6	6	6	6	6
Temp (TA, °C)	63	59	63	63	63	63	60

LDHA	Prom	E2	E3	E4-5	E5-6	E7-8
H ₂ O (μl)	25,8	30,8	29,8	29,7	30,7	12,8
Buffer 10X (μl)	5	5	5	5	5	2,5
dNTPs (μl)	4	4	4	4	4	2
Mg ⁺² (μl)	4	4	4	4	4	2
Primers (μl)	2	2	2	2	2	1
Enhancer 5X (μl)	5	-	-	-	-	2,5
Taq (μl)	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2
ADN (μl)	4	4	5	5	4	2
Temp (TA, °C)	63	66	66	60	60	60

El protocolo de amplificación para GSTP1 fue:

Desnaturalización inicial: 2 min a 95°C

30 ciclos: 30 seg a 95°C

30 seg a TA

1 min a 72°C

Elongación final: 10 min a 72°C

Solo en el caso de la amplificación del fragmento E6-7 se utilizó un protocolo de 35 ciclos.

En todos los casos el protocolo de amplificación para LDHA fue:

Desnaturalización inicial: 5 min a 95°C

35 ciclos: 30 seg a 95°C

30 seg a TA

1 min a 72°C

Elongación final: 10 min a 72°C

Buffer PBS 10X (100 ml)

NaCl 8,0 gr

KCl 0,22 gr

Na₂HPO₄ 1,15gr

KH₂PO₄ 0,20

Ajustar a pH 7,2 - 7,4

Protocolo de purificación de amplificados por precipitación con PEG

Protocolo ajustado para reacciones de PCR de 50 µl. Si el volumen de la PCR es diferente mantener las proporciones. En lo posible trabajar con guantes para evitar la contaminación con DNAsas.

- 1- Correr 3 a 5 µl de la PCR en un gel para verificar la amplificación.
- 2- Al resto de la reacción de PCR agregarle 100 µl de una solución de PEG 20% - NaCl 2,5 M, y mezclar en Vortex.
- 3- Incubar a 37 °C por 15 minutos.
- 4- Centrifugar a máxima velocidad (20.000 g) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 5- Descartar el sobrenadante.
- 6- Agregar 200 µl de etanol 70% suavemente por la pared del tubo para no levantar el pellet; dejar reposar 1 minuto.
- 7- Centrifugar a máxima velocidad (20.000 g) durante 5 minutos.
- 8- Eliminar la totalidad del etanol. Secar el pellet a 37°C durante 10 a 15 minutos. Asegurarse que no queden restos de etanol en el tubo. Un exceso en el secado dificulta la resuspensión.
- 9- Disolver el producto de PCR en 15 µl de agua bidestilada estéril. Resuspender completamente el pellet en Vortex. Ayuda incubar por unos minutos a 37°C. Si se trabajó con guantes para proteger de DNAsas se puede incubar toda la noche a 37°C.
- 10- Medir la concentración en un espectrofotómetro.

Comandos utilizados en los estudios de dinámica molecular

A continuación se muestran a modo de ejemplo, con archivos con nombres genéricos, los distintos comandos utilizados en la fase de producción de los estudios de DM, con los distintos parámetros aplicados en cada caso.

A partir de los archivos conteniendo los parámetros de la DM que se simulará (GSTP1.mdp), los datos de la topología del sistema (GSTP1.top) y las últimas coordenadas de cada átomo del sistema (GSTP1.gro), se prepara el archivo necesario para realizar la dinámica (GSTP1.tpr); adicionalmente, si se desea extender una DM anterior se puede incorporar al último *checkpoint* registrado (GSTP1.cpt) y las energías que tenía el sistema (GSTP1.edr):

```
> gmx grompp -f GSTP1.mdp -c GSTP1.gro -p GSTP1.top -t GSTP1.cpt -e  
GSTP1.edr -o GSTP1_a.tpr
```

Para llevar a cabo la DM:

```
> gmx mdrun -v -deffnm GSTP1_a
```

Luego de este paso se generan una serie de archivos, entre los que se encuentra uno que contiene las trayectorias de los átomos del sistema en el tiempo (GSTP1_a.xtc), sobre el cual se realizan los análisis. Primero se debe centrar el sistema en la proteína y evitar así los saltos en la celda de simulación cuando la proteína cruza los contornos; en este paso se seleccionó la proteína como molécula de referencia respecto a la cual centrar el sistema y que la salida contenga únicamente a la proteína (opción 1 en ambos casos):

```
> gmx trjconv -f GSTP1_a.xtc -s GSTP1.gro -o GSTP1_a-nojump.xtc -  
center -pbc nojump
```

Luego se quitan las rotaciones y traslaciones que tiene la proteína para facilitar su análisis y visualización; en este caso se selecciona el *backbone* (opción 4) para realizar el ajuste y la proteína (opción 1) como salida:

```
> gmx trjconv -f GSTP1_a.xtc -s GSTP1.gro -o GSTP1_a-rot-tras.xtc -  
fit rot+trans
```


Sobre esta última trayectoria es que se realizan los análisis, que tendrán como formato de salida la extensión “.xvg”. Para calcular la superficie expuesta al solvente en el tiempo para toda la proteína (opción 1):

```
> gmx sasa -s GSTP1.gro -f GSTP1_a-rot-tras.xtc -o SASA_GSTP1.xvg -tu ns
```

Para calcular el RMSD en el tiempo para el *backbone* ajustado sobre el *backbone* de la estructura al comienzo de la DM (opción 4 las dos veces):

```
> gmx rms -s GSTP1.gro -f GSTP1_a-rot-tras.xtc -o RMSD_GSTP1.xvg -tu ns
```

Para calcular el grado de fluctuación del RMSD en posiciones específicas, como el *backbone* (opción 4) o los *C alpha* (opción 3):

```
> gmx rmsf -s GSTP1.gro -f GSTP1_a-rot-tras.xtc -o RMSF_GSTP1.xvg -ox RMSF_GSTP1.pdb
```

Finalmente para calcular el radio de giro en el tiempo calculado para el *backbone* (opción 4):

```
> gmx gyrate -s GSTP1.gro -f GSTP1_a-rot-tras.xtc -o GYRATE_GSTP1.xvg
```

A modo de ejemplo para graficar cada una de las determinaciones con Grace:

```
> xmgrace -block archivo_1.xvg -bxy 1:2 -block archivo_2.xvg -bxy 1:2 -block archivo_3.xvg -bxy 1:2
```

1	-----MATLKDQLIQNLLKEEHV-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADEVAL	50
1	-----MATLKDQLIYNLLKEEQT-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	50
1	mgepsggtytqtstiffrakipfgsksnMATLKDQLIHNLKEEQT-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	79
1	-----MATLKDQLIQNLLKEEHV-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	50
1	mskssggtytqtstsvffhfkvsksksMATLKDQLIYNLLKEEQA-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	79
1	msessgsytytqtstifffhakipfasksnMATLKDQLIQNLLKEDHT-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	79
1	msessgsytytqtstifffhakipfasksnMATLKDQLIQNLLKEDHT-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	79
1	-----MATLKDQLIHNLKEEHV-PHNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	50
1	-----MASLKDQLIYNLLKEEQV-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	50
1	-----MASTKEKLIHVSKEQPaPTNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	51
1	-----MASVQEKLTICVQCKPaPTNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	51
1	-----MATVKDQLIQNLLKEEHV-PQNKITVGVGAVGMACAI SIIMKDLADELAL	50
51	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	130
51	VDVIEDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	130
80	VDVIEDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	159
51	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	130
80	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPH	159
80	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	159
80	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	159
51	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	130
51	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPH	130
52	VDVMDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	131
52	VDILEDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPD	131
51	VDVIEDKLGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSRLVI ITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPN	130
131	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	210
131	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	210
160	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	239
131	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	210
160	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	239
160	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	239
160	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	239
131	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	210
131	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	210
132	CIILVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	211
132	CIILVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	211
131	CKLLVSNFVDILTIVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWILGEHGDSSVPVWSGVNVAGVS	210
211	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	290
211	LKTLPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	290
240	LKTLPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	319
211	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	290
240	LKSLNPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGINEDVFLS	319
240	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	319
240	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	319
211	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	290
211	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	290
212	LQALNPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGMSVADLCE SILKNMHKCHPVSTLVKGMHGVNEEVFLS	291
212	LQSLNPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGMSVADLCE SILKNMHKCHPVSTLVKGMHGVNEEVFLS	291
211	LKNLHPDLGTADKEQWKAHVQVVDSEAYEVIKLGYYT SWAIGLSVADLAE SIMKNLRRVHP ISTMIKGLYGIKEDVFLS	290
291	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	332 Bos taurus
291	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	332 Homo sapiens
320	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	361 Pan troglodytes
291	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	332 Ovis aries
320	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	361 Mus musculus
320	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	361 Felis catus
320	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	361 Canis lupus familiaris
291	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	332 Sus scrofa
291	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	332 Ictidomys tridecemlineatus
292	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	333 Danio rerio
292	LPCVLNGLTSVINQKLDNEVGQLQKSAETLWSIQKDLkDL	334 Xenopus laevis
291	VPCILGQNGISDVVKVTLTTHHEEACLKKSADTLWGIQKEL-QF	332 Equus caballus

Figura 22. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína LDHA de diferentes especies. El alineamiento se realizó con la herramienta para alineamiento múltiple disponible en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) incluyendo la secuencia de GSTP1 de diferentes especies. La imagen muestra la conservación de los residuos: en rojo se muestran los residuos conservados y en gris las columnas que contienen gaps. Cuando más del 50% de las secuencias contienen un gap en una posición, los residuos se muestran en gris y en minúscula. Las secuencias utilizadas son: *B. taurus* (NP_803482), *H. sapiens* (NP_000843), *P. troglodytes* (XP_001152516), *O. aries* (XP_011972865), *M. musculus* (NP_038569), *F. catus* (XP_023095898), *C. lupus familiaris* (NP_001239096), *S. scrofa* (JAA74207), *I. tridecemlineatus* (XP_005333392), *D. rerio* (NP_571809), *X. laevis* (NP_001082252) y *E. caballus* (NP_001138352).

Trabajos publicados a partir de esta Tesis



Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

Study of the influence of genes related to muscle oxidative processes on beef color

A.H. Falomir-Lockhart^{a,1}, A. Rogberg-Muñoz^{a,b,*}, J. Papaleo-Mazzucco^c, D.E. Goszczynski^a, J.P. Lirón^a, M.E. Fernández^a, M.C. Añón^d, L.M. Melucci^c, G. Giovambattista^a^a IGEVET – Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (UNLP-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina^b Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina^c Unidad Integrada Balcarce (UIB) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce (INTA), Argentina^d CIDCA – Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (UNLP-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2014

Received in revised form 29 April 2015

Accepted 12 May 2015

Available online 14 May 2015

Keywords:

Oxidative processes

GSTP1

Meat color

Genetics

SNP

ABSTRACT

The biochemical bases of meat color are determined by the concentration and redox state of myoglobin, hemoglobin, cytochromes, and other pigments. Post-mortem depletion of cellular oxygen results in oxidative stresses that consume NADH and affects reducing activity, while enzymatic detoxification influences the cellular oxidative processes, both affecting meat color. The aim of this work was to study the influence of several genes related to cellular oxidative processes that could affect CIELAB meat color parameters. The study was performed in steers that received a grass-based diet combined with grain, hays and silages. Results suggest a possible link between colorimetric parameters (a^* , b^* and chroma) and SNPs in the GSTP1 gene ($P < 0.05$). Although the influence of the enzymes, encoded by GSTP1 gene, on meat color has been proposed previously at biochemical level and protein expression level, further association studies in different populations and functional studies of proteins are needed to confirm the genetic determination of that gene on meat color.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Meat color plays a critical role in determining consumers' purchasing decision, since it is the only characteristic perceived by the consumer in the market (Andrés et al., 2008) and is frequently used as an indicator of freshness and wholesomeness. In this sense, beef-steak quality has been equated to a bright red color (Behrends, Mikel, Armstrong, & Newman, 2003). Furthermore, it was estimated that around 15% of produced beef lose commercial value due to surface discoloration (Smith, Belk, Sofos, Tatum, & Williams, 2000). The red color of meat is the result of a number of intrinsic and extrinsic factors that have been widely studied (Mancini & Hunt, 2005).

The impact of oxidative processes on food components will affect the nutritional value, functional properties, texture, and perceived keeping quality of food (Bekhit, Hopkins, Fahri, & Ponnampalam, 2013). The biochemical bases of meat color are determined by the concentration and redox state of myoglobin, hemoglobin, cytochromes, and other pigments. Myoglobin is the primary protein pigment associated with meat color and the amount of deoxymyoglobin (DOMb, purple) and its derivatives oxymyoglobin (OMb, cherry-red) and metmyoglobin

(MetMb, brown) on the surface determine the final observable color (Bekhit, Cassidy, Hurst, & Farouk, 2007; Bekhit & Faustman, 2005). The presence of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) as a coenzyme is needed in reactions involved in the conversion of MetMb in its ferrous form DOMb, suggesting that this compound could also be responsible for color stability (Bekhit, Geesink, Ilian, Morton, & Bickerstaffe, 2003). Post-mortem depletion of cellular oxygen results in turn to pyruvate degradation to lactate by lactate dehydrogenase (LDH); this consumes NADH and consequently affects MetMb reducing activity and meat color (Kim, Keeton, Smith, Berghman, & Savell, 2009).

Glutathione (GSH) is an important reductant tripeptide that interacts with free radicals and acts as a cofactor in H_2O_2 degradation by peroxidase (Nelson & Cox, 2000), hence affecting intracellular oxidative processes. Glutathione-S-Transferase Pi 1 (GSTP1) and Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) play a key role in cellular detoxification and resistance to oxidative stresses, regulating the conjugation of GSH with different hydrophobic and electrophilic compounds (Lo Bello et al., 2001), and reducing organic peroxides at the expense of reduced glutathione (Nair et al., 2014), respectively. Superoxide dismutase is another important enzyme related to radical removal that catalyzes the dismutation of superoxide (O_2^-) into O_2 and H_2O_2 . Copper Chaperon for Superoxide Dismutase (CCS) interacts and activates copper/zinc superoxide dismutase (Rothstein et al., 2002). All influence cellular oxidative processes and could help to maintain the reducing activity of muscles post-mortem.

* Corresponding author at: IGEVET/UNLP-CONICET LA PLATA, Fac. Cs.Veterinarias UNLP, Calle 60 y 118 s/n (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

E-mail address: arogberg@fcv.unlp.edu.ar (A. Rogberg-Muñoz).

¹ These authors contributed equally to this manuscript.

As already mentioned, there are extrinsic and intrinsic factors affecting meat color, such as breed, age, pH, slaughter procedures and transportation (Mancini & Hunt, 2005). However some variability remains among individuals that could be controlled by other factors. Therefore, genetic differences might be one possible source for such variations. In this sense, several QTL that affect meat color in cattle have already been reported (Esmailzadeh et al., 2011; Reardon, Mullen, Sweeney, & Hamill, 2010); furthermore some authors found an association of CAPN1 markers with meat color parameters (Pinto et al., 2011), this gene is located in Chromosome 29 close to GSTP1 location. Additionally, the influence of LDHA in porcine meat color parameters (Otto et al., 2007) and the effect of GSH on bovine Omb reduction (Tang, Faustman, Lee, & Hoagland, 2003) have been established.

The objective of this work was to study the influence of several genes related to meat color and/or the cellular oxidative processes that could affect meat color parameters. Angus, Hereford and crossbred animals were used to test the association of SNPs in CCS, LDHA, Mb, GPX4, and GSTP1 genes with CIELAB meat color parameters.

2. Materials and methods

2.1. Animal resources

A cattle population previously used in various studies to evaluate supplementation strategies and/or crossbreeding systems at the Experimental Station of the National Institute of Agricultural Technology (INTA, Balcarce, Argentina) was used. Throughout the fattening period, animals grazed a *Lolium multiflorum*, *Dactylis glomerata*, *Bromus catarrhicus*, *Trifolium repens* and *Trifolium pretense* dominated semi-natural pasture. Whenever seasonal fluctuations on pasture growth or quality threatened a steady body weight gain over the period, animals were supplemented with either maize silage, maize grain or grass hay to meet their nutrient requirements, according to NRC (NRC, 2000). A total of 179 steers (15–18 months old and born between 2006 and 2009) were sampled. They belonged to different genetic groups and included purebred Angus (A) and Hereford (H), crossbreeds F1, F2, ¾ A–¼ H, and ¾ H–¼ A and a group produced by mating Limousin (L) sires to F1 cows (see online Supplementary material for details). All experimental procedures involving the use of animals were conducted in accordance with the Manual de Procedimientos sobre el Bienestar Animal (Handbook of Procedures for Animal Welfare), SENASA (National Service of Animal Health) of Argentina.

2.2. Meat sampling and physical determinations

After slaughter, a joint including the longissimus dorsi muscle (LD) between the 11th and 13th ribs was removed from the left half carcass, deboned before freezing until processing for analytical determinations at the University of Buenos Aires Meat Laboratory (Papaleo-Mazzucco et al., 2010). Meat color parameters (L^* : lightness; a^* : redness; and b^* : yellowness) were measured on the exposed LD muscle in the CIELAB system (CIE, 2004) using a Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japan). Calibration was performed against a white plate supplied by the manufacturer. The colorimeter has an 8 mm diameter measurement area and uses a light source of D₆₅ and 0° standard observer. Determinations were done in 2.5 cm thick steaks after blooming for 1 h at 4 °C. The color of the fat-free surface of each sample was assessed using the mean value of three color determinations. The parameters Chroma (C_{ab}^*), related to the intensity of color (higher when a^* of b^* are high), and Hue angle (h_{ab}), related to the change of color from red to yellow, were also calculated with the following equations:

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad h_{ab} = \arctan \frac{b^*}{a^*}.$$

Total lipids of muscle samples were extracted according to Folch, Lees, and Sloane-Stanley (1957), purified by alkaline methylation, and recovered on hexane. Fatty acid composition was measured using a gas chromatograph Shimadzu GC14B (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). Fatty acid methyl ester (FAME) separation was performed on a 100 m × 0.25 mm capillary column (Restek, Bellefonte, Pennsylvania, USA). The chromatograph was set at 140 °C for 1 min, increased from 140 to 240 °C at 4 °C per min, and then held constant at 240 °C for 20 min. The injector and detector were kept at 260 °C. Data was recovered using the GCSolution Software (Shimadzu Corp.) and the amount of each fatty acid was quantified by the internal standard technique (Supelco 37 FAME MIX, Sigma-Aldrich Co. LLC.) and expressed as percentage of total fatty acids. Total ether extract was determined measuring the amount of fat (extracted as ether) present in 100 g of fresh muscle without the external adipose tissue.

2.3. Markers and genotyping

DNA was extracted from meat samples with the method previously reported by Giovambattista et al. (2001). For this study, 11 SNPs were selected in five candidate genes that could influence meat color: Copper Chaperon for Superoxide Dismutase (CCS), CCS-1 (rs134083963) and CCS-2 (rs110015162); Lactate Dehydrogenase A (LDHA), LDHA-1 (rs41600268) and LDHA-2 (rs208422143); Myoglobin (MB), MB-1 (rs110676666) and MB-2 (rs136397633); Glutathione-S-Transferase Pi 1 (GSTP1), GSTP1-1 (rs110594162), GSTP1-2 (rs109060695) and GSTP1-3 (rs42188145); and Glutathione Peroxidase 4 (GPX4), GPX4-1 (rs134495045) and GPX4-2 (rs133501979) (see on line Supplementary material for further information of each SNP). SNPs were selected from the reported SNPs at NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) using the following criteria: i) the SNP must be located within the gene or in the close 5' UTR or 3' UTR regions, ii) polymorphism must be reported in either Angus or Hereford breeds. Genotyping was performed with the Sequenom platform (www.sequenom.com), Neogen genotyping service (USA, www.neogen.com).

2.4. Statistical analysis

2.4.1. Genetic variability

Allele frequencies, unbiased expected heterozygosity (h_e) and Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for each SNP were estimated using exact test implemented in GENEPop 4 (Rousset, 2008) and ARIQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) softwares. Linkage disequilibrium between SNP in the same gene and within genes was tested using HAPLOVIEW (Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005). Phases were reconstructed with Phase v2.1.1 (Li & Stephens, 2003) using default options. Phases were considered reliable when P value estimated by Phase was higher than 0.8.

2.4.2. Association test

The association analysis between genetic markers and meat color parameters was conducted using the following model:

$$y_{ijk} = SG_j + GE_k + AGE_i + pH_i + TEE_i + PUFA_i + e_{ijk}$$

where y_{ijk} is each studied trait (L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* , h_{ab}) and considers the fixed effects SG = Slaughtering group (that includes year, feeding group and slaughtering date) and GE = Genotype effect, and includes the covariables: pH , AGE = age at slaughtering, TEE = total ether extract, and $PUFA$ = percentage of total polyunsaturated fatty acids (PUFA), while e_{ijk} was the error of the model. Breed group was not considered in the model as it was tested and was not significant for the studied traits. The tests were performed using a GLM procedure of SAS 9.2 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Additionally, as 5 traits were tested, the adjusted P-values were calculated multiplying by 5 the obtained P-values.

3. Results and discussion

From the 11 genotyped SNPs, five were monomorphic or had low minimum allele frequencies (MAF < 0.05): one in LDHA gene (LDHA-2), one in MB gene (MB-2), one in GSTP1 gene (GSTP1-2) and two in GPX4 gene (GPX4-1, GPX4-2); the rest were used to estimate allele frequencies, unbiased expected h_e and HWE (Table 1).

The linkage test between SNPs located in chromosome 29 (see on line Supplementary material) showed two blocks that corresponded with the genes and reflected the distance between markers. The distance between genes (800 Mb) was not large and we detected a linkage between them. Within SNPs in the GSTP1 gene, the linkage was complete and there were only two possible haplotypes detected with the phasing test in the studied samples. There was a co-segregation of alleles in each SNP that could be explained by genetic drift, natural selection or any other genetic force and which was generated before the breeds (Hereford and Angus) were established, as both haplotypes are present in the two breeds. Furthermore, no recombination was detected, consistent with the distance between the markers (only 406 bp). The block comprised by SNPs in the CCS gene showed three possible haplotypes, indicating some recombination between markers (the distance is 13,051 bp) but not an independent segregation.

The association study results in a non-significant association for the SNPs in LDHA, CCS and Mb genes and evidenced a possible link between the polymorphisms in GSTP1 gene on meat color CIELAB parameters (Table 2). In particular, GSTP1 signals were found with a^* parameter, that measures redness and correlates with myoglobin color and amount (see Table 2). C_{ab}^* calculated parameter, related to the color of the sample, was also related with all SNPs in GSTP1. The influence of the enzyme, product of that gene, on meat color was suggested in previous researches performed at biochemical and protein expression levels. On the other hand, the reported genetic association of CAPN1 markers with meat color parameters (Papaleo-Mazzucco et al., 2010; Pinto et al., 2011) could be related to the actual reported results, as that gene is 2 Mb up-stream to the GSTP1 gene. Even though, the effect of GSH over meat color has been demonstrated (Tang et al., 2003) and as GSTP1 uses GSH as substrate, it is also a good candidate and positional gene to explain the associations of the chromosome region.

As previously stated, GSTP1 takes part in cellular detoxification and resistance to oxidative stress (Lo Bello et al., 2001), favoring pigment stability post-mortem. GSTP1 catalyzes the addition of reduced GSH to electrophilic species, such as the products of lipid peroxidation (Vasieva, 2011). The enhancement of OxyMb oxidation to MetMb by lipid oxidation has also been studied (Faustman, Sun, Mancini, & Suman, 2010). Both GSTP1 SNPs investigated are located in exons and are synonymous mutations, thus suggesting that they are in linkage disequilibrium with the causal mutation. Even though they could directly affect translation speed and protein secondary structure due to the differential availability of each specific tRNA. This effect was reported

Table 1
Allele frequencies, unbiased expected heterozygosity (h_e) and Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) for the six polymorphic markers.

Gen	SNP	Allele frequency		h _e	HWE (P-value)
CCS	CCS-1	C	0.254	0.379	1.000
		T	0.746		
	CCS-2	C	0.109	0.195	0.758
		T	0.891		
LDHA	LDHA-1	A	0.039	0.075	0.348
		G	0.961		
GSTP1	GSTP1-1	A	0.422	0.489	0.397
		G	0.578		
	GSTP1-3	C	0.429	0.491	0.627
		G	0.571		
MB	MB-1	C	0.765	0.360	0.622
		T	0.235		

Table 2
Means and standard deviations of CIELAB parameters associated for each genotype of GSTP1 studied SNPs. The numbers of animals for each genotype are detailed and superscript letters indicate least square significant differences between genotypes.

CIELAB parameter	GSTP1-1			GSTP1-3			GSTP1 haplotype			Model adjusted	
	A/G			C/G			AC/AC (42)			P-value	
	A/A (41)	A/G (85)	G/G (49)	C/C (42)	C/G (87)	G/G (46)	AC/AC (42)	GG/AC (86)	GG/GG (48)	P-value	
a^*	22.87 ^a ± 0.25	22.69 ^a ± 0.18	21.94 ^b ± 0.23	22.85 ^a ± 0.25	22.66 ^a ± 0.18	21.85 ^b ± 0.24	22.84 ± 0.25	22.66 ± 0.18	21.93 ± 0.23	0.053	
b^*	12.26 ± 0.19	12.11 ± 0.14	11.69 ± 0.18	12.24 ± 0.19	12.09 ± 0.14	11.61 ± 0.18	12.24 ± 0.19	12.08 ± 0.14	11.67 ± 0.18	0.34	
C_{ab}^*	25.96 ± 0.31	25.72 ± 0.22	24.86 ± 0.28	25.93 ^a ± 0.30	25.69 ^a ± 0.22	24.75 ^b ± 0.29	25.92 ± 0.31	25.69 ± 0.22	24.84 ± 0.28	0.082	

by Kimchi-Sarfaty et al. (2007) who proposed that the cumulative number of mutations in the coding regions of the gene could lead to a differential structure of the protein because of the folding available time of each specific codon sequence. In this study, the observed differences between GSTP1 haplotypes could have a similar explanation; further research must be done to confirm this hypothesis. In such case the AC haplotype would produce a GSTP1 enzyme with higher activity, leading to lower concentrations of the reactive species produced during lipid oxidation, preventing Mb oxidation and consequently maintaining color stability of muscle.

The remaining candidate genes were selected based on their biological function such as: i) being a pigmented protein of muscle (Mb) or affecting its redox stability through NADH availability (LDHA) and ii) being involved in cellular oxidative processes through GSH (CCS and GPX4). Previous reports suggest that myoglobin and color stability could be regulated by different NADH rates of supply via different LDH flux of muscles (Kim et al., 2009). The LDHA SNP investigated in this study is located at the 5' UTR region, the reason why it could affect gene transcription and consequently the concentration of the LDHA monomer and the ratio of the isomeric tetramers. The effect of GSH over cellular oxidative process and then through color stability was also reported (Lo Bello et al., 2001) and GSTP1 results are related to those. Even though, the results of the other genes related to GSH availability were different: CCS had non-significant results and GPX4 SNPs could not be evaluated because they were monomorphic in the studied sample. Considering only these results we cannot discard an influence of those genes over meat color.

4. Conclusions

The results suggest a possible link between the GSTP1 gene, related to oxidative processes, and meat color measured through CIELAB parameters. Interestingly, the haplotype study using two SNPs in the gene also detected a significant association and could be related to the QTL previously reported in the chromosome 29 region where GSTP1 is located. Further association studies in different populations and functional studies of the proteins are needed to confirm these results. This is one of the first studies linking polymorphisms in genes related to oxidative processes with meat color in cattle.

Acknowledgments

We like to thank Translator Lidia Adriana Di Maggio for correcting the English grammar of the manuscript. This study was supported by the PIP N° 11220090100379 from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Project V206 from Universidad Nacional de La Plata (UNLP) and N° 331 National Meat Program of Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.005>.

References

Andrés, S., Silva, A., Soares-Pereira, A.L., Martins, C., Bruno-Soares, A.M., & Murray, I. (2008). The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef *M. longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. *Meat Science*, 78(3), 217–224.

Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M.J. (2005). Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263–265.

Behrends, J.M., Mikel, W.B., Armstrong, C.L., & Newman, M.C. (2003). Color stability of semitendinosus, semimembranosus, and biceps femoris steaks packaged in a high-oxygen modified atmosphere. *Journal of Animal Science*, 81(9), 2230–2238.

Bekhit, A.E.D., Cassidy, L., Hurst, R.D., & Farouk, M.M. (2007). Post-mortem metmyoglobin reduction in fresh venison. *Meat Science*, 75(1), 53–60.

Bekhit, A.E.D., & Faustman, C. (2005). Metmyoglobin reducing activity. *Meat Science*, 71(3), 407–439.

Bekhit, A.E.D., Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D., & Bickerstaffe, R. (2003). The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry*, 81(2), 175–187.

Bekhit, A.E.D., Hopkins, D.L., Fahri, F.T., & Ponnampalam, E.N. (2013). Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: Sources, markers, and remedies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 565–597.

CIE (International Commission on Illumination) (2004). Colorimetry technical report.

Esmailzadeh, A.K., Morris, C.A., Cullen, N.G., Kruk, Z.A., Lines, D.S., Hickey, S.M., ..., & Pitchford, W.S. (2011). Genetic mapping of quantitative trait loci for meat quality and muscle metabolic traits in cattle. *Animal Genetics*, 42(6), 592–599.

Excoffier, L., & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S.P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86(1), 86–94.

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.

Giovambattista, G., Ripoli, M.V., Lirón, J.P., Villegas Castagnasso, E.E., Peral-García, P., & Lojo, M.M. (2001). DNA typing in a cattle stealing case. *Journal of Forensic Sciences*, 46(6), 1484–1486.

Kim, Y.H., Keeton, J.T., Smith, S.B., Berghman, L.R., & Savell, J.W. (2009). Role of lactate dehydrogenase in metmyoglobin reduction and color stability of different bovine muscles. *Meat Science*, 83(3), 376–382.

Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.-W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., & Gottesman, M.M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315(5811), 525–528.

Li, N., & Stephens, M. (2003). Modeling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. *Genetics*, 165(4), 2213–2233.

Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Caccuri, A.M., Stella, L., Parker, M.W., Rossjohn, J., ..., & Ricci, G. (2001). Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers: A new role for an old enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42138–42145.

Mancini, R.A., & Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100–121.

Nair, A.R., Lee, W.-K., Smeets, K., Swennen, Q., Sanchez, A., Thévenod, F., & Cuypers, A. (2014). Glutathione and mitochondria determine acute defense responses and adaptive processes in cadmium-induced oxidative stress and toxicity of the kidney. *Archives of Toxicology* [Epub ahead of print] <http://link.springer.com/article/10.1007/s00204-014-1401-9#>.

Nelson, D., & Cox, M. (2000). Glycolysis and the catabolism of hexoses. *Lehninger's Principles of Biochemistry* (pp. 527–566) (3rd edn.). New York, USA: Worth Publishers.

NRC (National Research Council) (2000). Nutrient requirements of beef cattle. (7th ed.). Washington D.C.: National Academy Press.

Otto, G., Roehre, R., Looft, H., Thoenking, L., Knap, P.W., Rothschild, M.F., ..., & Kalm, E. (2007). Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Science*, 75(2), 185–195.

Papaleo-Mazzucco, J., Melucci, L.M., Villarreal, E.L., Mezzadra, C.A., Soria, L., Corva, P., ..., & Miquel, M.C. (2010). Effect of ageing and μ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. *Meat Science*, 86(3), 878–882.

Pinto, L.F.B., Ferraz, J.B.S., Pedrosa, V.B., Eler, J.P., Meirelles, F.V., Bonin, M.N., ..., & Silva, R.C.G. (2011). Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 2057–2064.

Reardon, W., Mullen, A.M., Sweeney, T., & Hamill, R.M. (2010). Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Science*, 86(2), 270–275.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Corson, L.B., Becker, M., Cleveland, D.W., Price, D.L., ..., & Wong, P.C. (2002). The copper chaperone CCS is abundant in neurons and astrocytes in human and rodent brain. *Journal of Neurochemistry*, 72(1), 422–429.

Rousset, F. (2008). Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.

Smith, G.C., Belk, K.E., Sofos, J.N., Tatum, J.D., & Williams, S.N. (2000). Economic implications of improved color stability in beef. In E.A. Decker, C. Faustman, & C.J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality* (pp. 397–426). New York, USA: John Wiley and Sons.

Tang, J., Faustman, C., Lee, S., & Hoagland, T.A. (2003). Effect of glutathione on oxymyoglobin oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1691–1695.

Vasieva, O. (2011). The many faces of glutathione transferase pi. *Current Molecular Medicine*, 11(2), 129–139.



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Computational prediction of nsSNPs effects on protein function and structure, a prioritization approach for further *in vitro* studies applied to bovine GSTP1

A.H. Falomir-Lockhart^{a,*}, E.E. Villegas-Castagnaso^a, G. Giovambattista^a, A. Rogberg-Muñoz^{a,b}^a IGEVET — Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (UNLP-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina^b Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

In silico study

NsSNPs

Protein

GSTP1

Apoptosis

Oxidative stress

ABSTRACT

The development of high-throughput technologies in the last decade produced an exponential increase in the amount of biological data available. The case of redox biology and apoptosis is not an exception, and nowadays there is a need to integrate information from multiple “omics” studies. Therefore, validation of proposed discoveries is essential. However, the study in biological systems of the effect of the massive amounts of sequence variation data generated with next-generation sequencing (NGS) technologies can be a very difficult and expensive process. In this context, the present study aimed to demonstrate the advantages of a computational methodology to systematically analyze the structural and functional effects of protein variants, in order to prioritize further studies. This approach stands out for its easy implementation, low costs and low time consumed. First, the possible impact of mutations on protein structure and function was tested by a combination of tools based on evolutionary and structural information. Next, homology modeling was performed to predict and compare the 3D protein structures of unresolved amino acid sequences obtained from genomic resequencing. This analysis applied to the bovine GSTP1 allowed to determine that some of amino acid substitutions may generate important changes in protein structure and function. Moreover, the haplotype analysis highlighted three structure variants worthwhile studying through *in vitro* or *in vivo* experiments.

1. Introduction

The development of high-throughput technologies in the last decade produced an exponential increase in the amount of biological data available. The growth of the “omics” fields allowed the detection of variations in molecular components at different levels [1]; thereby, from one sample it might be obtained information from its genome structure and variants, genes and proteins expression patterns, and metabolites concentration and fluxes, among others [2]. The case of redox biology and apoptosis is not an exception, and nowadays there is a need to integrate information from proteomic, genomic, transcriptomic and metabolomic studies [3–5]. Considering this vast spectrum and amount of information, the increase of false positive signals has been proved and discussed [6,7], hence validation of proposed discoveries is essential [8]. For this task, identifying worthwhile

studying cases, separating true signals from false ones, is challenging, and, in this sense, *in silico* studies could help identifying and prioritizing results to be further *in vitro* or *in vivo* validated.

In particular, the next-generation sequencing (NGS) technologies generate massive amounts of information on sequence variability. However, the study of the effect of such great volume of sequence variation data in a biological system can be a very difficult and expensive process. On the contrary, *in silico* analysis methods are easy to perform, cost-effective, reliable and less time-consuming [9], offering a feasible solution to assess the potential impact of amino acid changes. Since these techniques are based on protein structure and sequence, they can predict phenotypic changes arising from genomic variation. Particularly, non-synonymous SNPs (nsSNPs) modify the sequence of proteins and could possibly affect their activity. Therefore, our ability to select nsSNPs for experimental studies can be enhanced by

Abbreviations: GSH, Glutathione; GST, glutathione S-transferase; GSTP1, GST pi class 1; NGS, next-generation sequencing; SNP, single nucleotide polymorphism; nsSNP, non-synonymous SNP; p-mRNA, predicted mRNA; p-Prot, predicted protein; RMSD, root mean square deviation; DDG, unfolding Gibbs free energy change

* Corresponding author.

E-mail addresses: agusfalomir@gmail.com (A.H. Falomir-Lockhart), eglevillegasc@gmail.com (E.E. Villegas-Castagnaso), guillermogiovambattista@gmail.com (G. Giovambattista), arogberg@yahoo.com.ar (A. Rogberg-Muñoz).

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.403>

Received 29 May 2018; Received in revised form 20 September 2018; Accepted 3 October 2018

Available online 10 October 2018

0891-5849/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

performing preliminary *in silico* studies, analyzing the potential impact of an amino acid variant on protein structure and function [10].

Within cell redox state, Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) is a key enzyme. This enzyme is part of the Glutathione S-transferases (GSTs, E.C. 2.5.1.18) superfamily found in organisms from all kingdoms of life, with important biological roles and multiple biomedical and biotechnological applications [11]. One of GSTs major roles is cell protection against xenobiotic substances and products of oxidative stress, conjugating electrophilic and hydrophobic substrates and reactive oxygen species with glutathione (GSH). In addition, GSTs show non-catalytic functions modulating signaling processes that regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis [12,13]. Previous studies have shown that GSTP1 haplotypes have differential effects on cellular proliferation and apoptosis [14]. While many studies have focused on correlating the *post mortem* activity of antioxidant enzymes with oxidation processes, the information on the role of GSTP1 on muscle oxidative deterioration and apoptosis is relatively scarce [15,16]. When the animal dies, muscle cells remain alive for a period of time until oxygen and nutrients depletion, herein, the first steps of the *post mortem* conversion of muscle into meat could be used as a model of cellular extreme oxidative stress. In this sense, apoptosis is believed to be the beginning of a complex process that includes a number of physiological and physicochemical changes which occur during and shortly after harvesting [17].

In this research we present a computational methodology to analyze the effects of variants on protein structure and function, to select the haplotype variants to be further studied by *in vitro* biochemical assays. The utility of this method is presented for the case of bovine GSTP1 structural variants in the context of the redox stability and apoptosis related to the conversion of muscle into meat, based on the hypothesized that an alteration in GSTP1 protein activity due to structural variants would lead to differential *post mortem* apoptosis development and hence differential muscle oxidative stability.

2. Materials and methods

2.1. DNA samples, resequencing and haplotype reconstruction

Purified DNA samples were selected from the Veterinary Genetics Institute DNA Sample Bank (IGEVET, UNLP-CONICET; <http://www.igevet.gob.ar>). DNA was extracted from hair using the NaOH/HCl protocol [18] or blood using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), following the manufacturer's instructions. The resequencing set comprised 13 bovine DNA samples from several breeds (Angus, Brahman, Creole, Hereford, Holstein, Nellore and Wagyu) to make best use of genetic diversity. The coding regions of the GSTP1 gene were amplified using the primers and PCR protocols detailed in Supplementary Table 1; they were then sequenced using the sequencing facilities available at IGEVET (<http://www.igevet.gob.ar/servicios.html>). The obtained sequences were aligned and analyzed to identify the polymorphic positions using DNAMAN v4.15 (Lynnon Corp., Canada). Finally, haplotypes were reconstructed with PHASE v2.1.1 ran with standard parameters [19] and predicted mRNA (p-mRNA) and protein (p-Prot) were obtained for each GSTP1 haplotype.

2.2. Functional analysis of GSTP1 amino acid substitutions

For the functional analysis, several open source tools for sequence- and structure-based approaches were employed to analyze and compare the amino acid substitution effect on the structure, function and stability of the predicted proteins. The reported consensus GSTP1 protein (NP_803482.1) at the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) was used as control and for comparison with each of the one amino acid substituted theoretical proteins. The following tools were used:

SIFT - Sorting Intolerant from Tolerant (<http://sift.jcvi.org/www/>)

SIFT_seq_submit2.html) [20] was used to predict the deleterious score of the substituted amino acids according to the conservation of each residue from an evolutionary point of view. Output scores were classified as damaging (0–0.05), potentially damaging (between 0.05 and 0.10), and neutral (above 0.10).

PROVEAN - Protein Variation Effect Analyzer (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) was used to predict the possible deleterious effect of an amino acid substitution on protein structure and function. Protein variants were considered deleterious if the final output score was below the threshold score of -2.5 , and neutral if it was above such score.

PolyPhen-2 - Polymorphism Phenotyping v2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [21] was used to predict the possible impact of amino acid substitutions on protein structure and function by using straightforward physical and evolutionary comparative considerations. Mutations were classified as probably damaging (≥ 0.85), possibly damaging (0.15–0.85), and benign (0.00–0.15).

PANTHER (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>) was used to further analyze the effect of mutations on protein function from an evolutionary point of view. Mutations were classified as probably damaging, when the preservation time of a residue was greater than 450 million years; possibly damaging, when it was between 200 and 450; and probably benign if it was less than 200.

MutPred2 (<http://mutpred.mutdb.org/>) [22] was used to calculate the probability that an amino acid substitution was pathogenic (over 0.8) or non-pathogenic (below 0.8).

I-Mutant Suite 3.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>) [23] was used to predict protein stability changes due to single-site mutations, according to the change in unfolding Gibbs free energy (DDG) between the wild type and the mutated proteins. Mutations were classified as largely destabilizing protein structure (DDG lower than -0.5 Kcal/mol), largely stabilizing (DDG higher than 0.5 Kcal/mol), or as having a weak effect (DDG between -0.5 and 0.5 Kcal/mol). The input used here was the structure of the reported GSTP1 protein at NCBI, modeled with the I-TASSER server (Iterative Threading ASSEmblY Refinement; <https://zhanglab.cmbb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [24].

HOPE - Have (y)Our Protein Explained (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>) [25] was used to obtain a prediction and an analysis of the effect of each mutation found on the 3D structure and function of GSTP1. This server performs a BLAST search on several databases such as UniProt and the Protein Data Bank (PDB) to collect structural information and generate the analysis.

2.3. Molecular modeling and visualization

The tertiary structure of the GSTP1 protein was modeled to compare the structures of the native and mutant proteins. Since *Bos taurus* GSTP1 protein tertiary structure is not yet available in the PDB, the I-TASSER server was used to model the 3D structure of the primary sequence of GSTP1 obtained from the NCBI database. Then, haplotypes obtained after the resequencing step were also 3D-modeled with I-TASSER. Afterwards, Swiss PdbViewer (v4.1.0) (<http://www.expasy.org/spdbv/>) [26] was used for model visualization and image generation. In addition, this software was used to estimate p-Prot volume and surface and the cavity containing the active site. The deviation between haplotypes and the consensus modeled structures was evaluated by their Root Mean Square Deviation (RMSD) values.

3. Results

3.1. Sequencing and haplotype reconstruction summary

Sequence alignment allowed to detect a total of 36 polymorphic positions located in exons (15), 5'UTR region (8) and promoter (13) (Supplementary Figure 1). A total of 24 possible haplotypes were obtained with PHASE, taking into account all the detected SNPs. For

Table 1
Amino acid substitutions predicted with DNA resequencing analysis.

p-Prot	N° of p-mRNA	3	15	33	34	43	44	48	60	65	68	70
Consensus sequence ^a		P	C	V	V	P	L	C	D	Q	A	L
I	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
II	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Q
III	1	–	–	–	L	Q	F	G	–	–	–	–
IV	1	–	–	F	–	–	–	–	–	–	–	–
V	1	–	W	–	–	–	–	–	–	–	–	–
VI	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	T	–
VII	1	S	–	–	–	F	–	N	H	–	–	Q

p-Prot: predicted protein; p-mRNA: predicted mRNA.

^a Consensus protein sequence from the NCBI database NP_803482.1.

protein diversity analysis, only SNPs located in the exonic regions were considered, obtaining a total of 11 different p-mRNA (Supplementary Table 2). Further, the analysis of the corresponding amino acid sequence for those p-mRNAs resulted in seven possible translated primary structures (p-Prot) for GSTP1 protein, including 11 non-synonymous amino acid substitutions distributed in the different breeds when compared to the reported sequence of this protein (Table 1).

3.2. Effect of the predicted non-synonymous amino acid changes on structure and stability

To determine whether the identified non-synonymous amino acid substitutions affected GSTP1 function or stability, we further analyzed these variants using six *in silico* prediction algorithms: SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, PANTHER, MutPred 2 and I-Mutant 3.0. Table 2 summarizes the results obtained for each amino acid substitution analyzed individually. We also used Project HOPE to have an insight of each amino acid substitution and of the possible effect on protein structure and function. It is important to remark that these are all analysis of single-site mutations comparing the stability of a theoretically one mutated amino acid protein with the consensus.

To improve the strength of our analysis, data were evaluated by combining all the tools used. Briefly, SIFT and PROVEAN categorized the variants equivalently. The six variants detected by SIFT as damaging or potentially damaging (C15W, C48G, Q65H, L70Q, V33F and D60N) were also detected as deleterious by PROVEAN; the rest were neutral with both tools. PolyPhen-2 and PANTHER also detected four and three variants, respectively, of those six previously detected. PolyPhen-2 detected a new probably damaging substitution (A68T), while PANTHER classified two new substitutions as possibly damaging (V33F and L44F). In addition, we performed I-Mutant 3.0 analysis of GSTP1 in order to add another layer of refinement to the amino acid

substitution characterization, by considering the DDG change between the native and mutated protein. This analysis yielded a significant decrease of almost all of the substitutions and the highest change (–2.58 Kcal/mol) for L70Q.

In each algorithm, distinct parameters were used to evaluate the amino acid substitutions; the higher the number of significant results for the substitution, the more likely they genuinely affected the structure and function of the protein. Thereby, whereas some substitutions did not apparently affect (P3S, P43Q, L44F) or had a low influence (V33F, V34L) on GSTP1 structure and stability, others exerted a stronger influence (C15W, C48G, D60N, Q65H, A68T, L70Q).

3.3. Assessment of the effects of mutations on tertiary protein structure and function

In order to further the study of these amino acid substitutions and analyze their individual impact on protein structure and function, we performed subsequent HOPE analysis. The results showed that in most comparisons, the wild-type and mutant residues differed in their properties.

All the possible substitutions occurred in the GSTP1 N-terminal domain, where the binding site for GSH is located; from those substitutions, eight were also in contact with another domain of the protein (P3S, V33F, V34L, P43Q, L44F, C48G, D60N, L70Q). Hence their substitution may modify the interactions between those two domains. To summarize, most of the amino acids were substituted with larger residues (with the exception of P3S and C48G), leading to possible steric problems and differences in protein folding. Furthermore, some residues were substituted with less hydrophobic amino acids (P3S, P43Q, C48G, A68T, L70Q), which would generate a possible loss of hydrophobic interactions. On the other hand, since some residues were located near (C15W and L44F) or directly involved (Q65H) in GSH binding, their substitution could disturb the local structure and therefore protein activity. Finally, primary structure analysis of homologous proteins showed that many of these positions were not conserved, some of the new residues had similar properties to the homologous protein alternative residues (V34L, P43Q, L70Q), and some had different properties (P3S, V33F, C48G). In two cases, the mutant residue appeared as a possible alternative amino acid (L44F and D60N), making a substitution more likely to occur.

3.4. Protein structure homology modeling and analysis

So far, all substitutions were analyzed individually. Therefore, in order to compare the accumulated effect of the different mutations, the observed DNA sequencing predicted haplotypes were considered. As

Table 2
In silico analysis of the individual alternative amino acid substitutions detected in the resequencing stage, using different web-based tools.

Amino acid position	3	15	33	34	43	44	48	60	65	68	70
NCBI Reference NP_803482.1	P	C	V	V	P	L	C	D	Q	A	L
Alternative amino acid	S	W	F	L	Q	F	G	N	H	T	Q
Web-based tools											
SIFT ^a	0.3	0.02 [*]	0.1 [*]	0.12	0.5	0.23	0.05 [*]	0.06	0 [*]	0.34	0 [*]
PROVEAN ^b	–2.135	–5.652 [*]	–3.459 [*]	–2.043	0.162	–1.498	–7.753 [*]	–3.634 [*]	–4.704 [*]	–2.102	–5.315 [*]
PolyPhen-2 ^c	0.006	1 [*]	0.097	0.001	0.018	0.017	0.279 [*]	0.021	1 [*]	0.979 [*]	1 [*]
PANTHER ^d (millions of years)	176	176	361	750 [*]	86	361	750 [*]	750 [*]	750 [*]	1629 [*]	750 [*]
MutPred 2 ^e	0.483	0.898 [*]	0.279	0.220	0.236	0.121	0.822 [*]	0.441	0.897 [*]	0.829 [*]	0.928 [*]
I-Mutant 3.0 ^f (Kcal/mol)	–1.18 [*]	–1.02 [*]	–1.01 [*]	–0.81 [*]	–0.95 [*]	–0.88 [*]	–1.21 [*]	–0.06	–1.15 [*]	–0.75 [*]	–2.58 [*]

* Highlights the significant predictions from each web-based tool.

^a p-value < 0.05: damaging; 0.05–0.10: potentially damaging; > 0.10: neutral.

^b score < –2.5: deleterious; > –2.5: neutral.

^c probability > 0.85: probably damaging; 0.15–0.85: possibly damaging; < 0.15: benign.

^d preservation time > 450: probably damaging; 200–450: possibly damaging; < 200: probably benign.

^e probability > 0.8: pathogenic; < 0.8: non-pathogenic.

^f Unfolding Gibbs free energy change (DDG) < –0.5: large decrease of stability; –0.5–0.5: neutral; > 0.5: large increase of stability.

Table 3
Surface and volume of the modeled proteins and active site, and Root mean square deviation (RMSD) of the models against the consensus.

p-Prot	Protein		Active site		Backbone RMSD
	Surface	Volume	Surface	Volume	
I	9493	25,525	743	741	–
II	9142	25,782	818	762	0.378
III	9365	25,802	884	1102	0.473
IV	9331	25,673	745	757	0.411
V	9211	25,769	701	650	0.448
VI	9467	25,751	469	464	0.486
VII	8975	26,004	666	633	0.419
5GSS_A	8969	25,119	858	794	0.595

Backbone RMSD is the average difference in the position of the protein backbone atoms compared with the consensus. Consensus (p-Prot I).

previously described, seven different translated proteins were obtained from the 11 different haplotypes due to synonymous mutations.

Unfortunately, no crystallized structure of bovine GSTP1 was publicly available in the PDB at the moment of this analysis. Therefore, all the 3D structures were modeled using the I-TASSER server to compare the wild-type and mutant proteins. For wild-type GSTP1, the protein sequence available in the NCBI database (NP_803482.1) was used, whereas for the mutant proteins, the seven p-Prot translated from the eleven p-mRNAs were used. Despite I-TASSER is configured to show five alternative models with the best score, only one structure was generated for all seven p-Prot, indicating how conserved the structure of this protein family is. Furthermore, the alignment of the GSTP1 primary sequence from different species showed little residue variations, and the GSH binding amino acids were particularly highly conserved (Supplementary Figure 2).

The structures modeled were further analyzed using the Swiss PdbViewer software. The protein and active site areas and volumes were determined, as well as the RMSD of the backbone atoms of each p-Prot from those of the modeled consensus sequence (Table 3). Since there is no bovine GSTP1 structure published to compare, the human crystallized structure 5GSS_A was used instead. The 5GSS_A structure has an 86% sequence identity with the bovine GSTP1, with an additional 11% if amino acid similarity is considered, meaning it is a very similar protein. Briefly, little variation was found in total protein surface and volume, whilst more notorious changes were detected in surface and volume of the cavity containing the active site.

4. Discussion

As was set there is a need to differentiate the false positive results and prioritize variants for the biochemical analysis [8]. Analysis of the NCBI dbSNP database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) showed that genes coding these enzymes present a high number of polymorphic positions, many of which occur in coding regions. Accordingly, in this research a total of 128 SNPs were found in the bovine GSTP1 gene (mutation rate, one SNP every 25.6 bp), which was higher than the approximated rate of one SNP every 100 bp reported [27]. From those variants, 36 were located within the coding regions (mutation rate, one SNP every 30.2 bp), demanding a prioritization to adequate and optimize resources when deciding further *in vitro* or *in vivo* studies. Additionally, a high diversity of the DNA sequence was observed when comparing the gene in different species, despite, a high degree of conservation was observed in protein primary sequence (Supplementary Figure 2) suggesting that the genetic variation should not affect greatly the protein to persist.

Within all the genomic information, non-synonymous SNPs (nsSNPs) are important factors contributing to the functional diversity of the encoded proteins within and between populations. In this sense, prediction of the functional consequences of genetic variations would

help understand the molecular mechanisms underlying the observed phenotypic variability. Synonymous SNPs could lead to RNA molecules with possible different translation rates, which would have an impact on protein folding, yielding altered conformations and ultimately varying total enzyme activity [28]. In this study, we analyzed the protein predicted tertiary structure, without considering synonymous mutations since they would not produce differences in the primary structure of proteins. Likewise, SNPs located in the promoter/regulatory region and introns may also have an effect on the phenotype due to differential expression levels and altered mRNA conformation [29,30]. Thereby, performance of wet laboratory experiments to study the biological significance of each SNP would be a highly laborious task as the great number of SNPs and their combinations would lead to an exponential number of expensive and time-consuming experiments. Nowadays, bioinformatics tools can be used for prioritization through a better understanding of the effects caused by those genomic variants and the screening of potentially deleterious SNPs, before conducting further investigations [31].

Firstly the effect of each nsSNP can be analyzed to detect which of them would have an effect on the protein structure and function. For that task, the genetic variants can be studied using sequence- and structure-based algorithms, such as SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, PANTHER, MutPred 2 and I-Mutant 3.0. This analysis provides information from evolutionary and energetic points of view, analyzing the conservation of residues in comparison to multiple alignments. From the functional analysis, concordant results of all the tools indicated that C15W, C48G, Q65H and L70Q may have an impact on protein structure or function. Structure-based prediction using I-Mutant 3.0 also showed that almost all possible amino acid substitutions were highly destabilizing (only D60N resulted in a neutral change in protein stability), in agreement with the high degree of sequence conservation of this protein among different species. Results of *in silico* analysis using HOPE were in agreement as well. As this enzyme acts non-enzymatically in the apoptotic pathways [13] any structural variation could lead to changes in the regulation of these processes. Additionally, since all substitutions were located in the N-terminal domain (Supplementary Figure 3), they would be important for the binding of other molecules and the activity of GSTP1, especially glutamine in Q65H, which is directly involved in GSH binding. It is worth noting that, besides binding GSH, the residues around the pocket containing the active site define the specificity for the second substrate. This suggests that changes in molecular interactions and misfolding can affect protein structure and function, and that these variants might be functionally involved in differential oxidative stability and apoptosis development.

A second step in this methodology is studying the haplotypes, in order to evaluate the combined effect of the variants. In this sense, the modeling of the tertiary structure of proteins allows to further understand the effect of the possible amino acid substitutions. To begin with, the consensus sequence of the protein was observed in all the breeds studied (Table 1). Furthermore, its predicted structure showed an active site volume and surface slightly deviated from the human crystallized protein. Regarding the rest of p-Prot, four presented only one amino acid substitution (II, IV, V and VI), while p-Prot III and VII presented multiple amino acid substitutions. The substitution IV (V33F), where valine was substituted by a bigger but still hydrophobic phenylalanine, it may not result in a relevant change as this residue was protruding outwards on the surface of the structure. While p-Prot II and V structures presented substitutions located inside the modeled structures, these may influence protein folding, damaging protein structure and function. In p-Prot V (C15W), the small hydrophilic cysteine is substituted by a big, hydrophobic tryptophan that may generate steric problems, evidenced in the reduction in surface and volume of the active site. On the other hand for p-Prot II (L70Q) the appearance of a polar glutamine may generate a disruption of the interaction within the core. On the contrary, the analysis of the modeled structure of p-Prot VI

showed that it had the greatest deviation from the consensus according to RMSD results due to a reduction in the active site volume and surface by almost a half. The A68T substitution produced a change in amino acid properties, as the nonpolar alanine was replaced by a threonine capable of generating new hydrogen bonds in the surroundings of the active site (Supplementary Figure 4).

In the case of p-Prot III and VII, they presented multiple amino acid substitutions, which reflected in the structure results. In p-Prot III, the increased volume of the active site may be explained by the substitution of the rigid proline in P43Q and the introduction of the flexible glycine in C48G, in an α -helix near the active site (Supplementary Figure 5a). This structure is located in an important loop that connects the two typical structural motifs of a thioredoxin-like fold that constitutes the structure of GSTs N-terminal domain [32]. Even though not predicted as damaging, the rest of the substitutions in this structure were also located in this loop (Supplementary Figure 5b), possibly contributing to the observed differences in active site surface and volume. On the other hand, p-Prot VII included probably the most important substitution, Q65H, affecting a residue directly involved in GSH binding. Furthermore, the surface and volume of the active site were greatly reduced, making this an interesting variant to be studied *in vitro*, since a change in substrate binding, and therefore in enzymatic activity, would be expected.

In summary, the presented methodology allowed to determine that some of the predicted amino acid substitutions may generate important changes in protein structure and function, and are good candidates to be further studied in *in vitro* or *in vivo* experiments. These changes could affect either the enzymatic activity, by altering the affinity for the substrates, the reaction speed or the release of the products, or the non-enzymatic function, through a protein-protein interaction variation. Moreover, the haplotype analysis enhanced this computational approach highlighting that the predicted structures III, VI and VII presented the greatest deviations in the protein structure or the active site volume and surface, thus becoming prioritized structures for further studies.

5. Conclusions

The present study aimed to demonstrate the advantages of a computational methodology to systematically analyze the structural and functional effects of protein variants, in order to prioritize further studies. This approach stands out for its easy implementation, low costs and low time consumed. First, the possible impact of mutations on protein structure and function was tested by a combination of tools based on evolutionary and structural information. Next, homology modeling was performed to predict and compare the 3D protein structures of unresolved amino acid sequences obtained from genomic resequencing. This analysis applied to the bovine GSTP1 highlighted three structure variants worthwhile studying *in vitro*.

Acknowledgments

The authors would like to thank Translator A. Di Maggio for careful assistance in manuscript correction and edition. This study was supported by the PUE No 2016-22920160100004CO from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and Project V247 from Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.403>.

References

- [1] M.V. Schneider, S. Orchard, Omics technologies, data and bioinformatics principles, in: B. Mayer (Ed.), *Bioinformatics Omi Data*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011, pp. 3–30, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-027-0_1.
- [2] D. Field, S.-A. Sansone, A. Collis, T. Booth, P. Dukes, S.K. Gregurick, K. Kennedy, P. Kolar, E. Kolker, M. Maxon, S. Millard, A.-M. Mugabushaka, N. Perrin, J.E. Remacle, K. Remington, P. Rocca-Serra, C.F. Taylor, M. Thorley, B. Tiwari, J. Wilbanks, *Omics Data Sharing, Sci.* (80-) 326 (2009) 234–236, <https://doi.org/10.1126/science.1180598>.
- [3] J.C. Reed, K.S. Doctor, A. Godzik, The domains of apoptosis: a genomics perspective, *Sci. Stke*. 2004 (2004) re9, <https://doi.org/10.1126/stke.2392004re9>.
- [4] M. Thamsen, U. Jakob, The redoxome: proteomic analysis of cellular redox networks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15 (2011) 113–119, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.013>.
- [5] R.-S. Wang, W.M. Oldham, B.A. Maron, J. Loscalzo, Systems biology approaches to redox metabolism in stress and disease states, *Antioxid. Redox Signal.* 29 (2018) 953–972, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7256>.
- [6] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57 (1995) 289–300, <http://www.jstor.org/stable/2346101>.
- [7] M.J. Marino, How often should we expect to be wrong? Statistical power, P values, and the expected prevalence of false discoveries, *Biochem. Pharmacol.* 151 (2018) 226–233, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.011>.
- [8] J.P.A. Ioannidis, M.J. Khoury, Improving validation practices in “omics” research, *Science* 334 (2011) 1230–1232, <https://doi.org/10.1126/science.1211811>.
- [9] P.K. Singh, K.N. Mistry, A computational approach to determine susceptibility to cancer by evaluating the deleterious effect of nsSNP in XRCC1 gene on binding interaction of XRCC1 protein with ligase III, *Gene* 576 (2016) 141–149, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.084>.
- [10] T.A. Masoodi, V. Rao Talluri, N.A. Shaik, J.Y. Al-Aama, Q. Hasan, Functional genomics based prioritization of potential nsSNPs in EPHX1, GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes for breast cancer susceptibility studies, *Genomics* 99 (2012) 330–339, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.04.006>.
- [11] M. Kosloff, G.W. Han, S.S. Krishna, R. Schwarzenbacher, M. Fasnacht, M.-A. Elsiger, P. Abdubek, S. Agarwalla, E. Ambing, T. Astakhova, H.L. Axelrod, J.M. Canaves, D. Carlton, H.-J. Chiu, T. Clayton, M. DiDonato, L. Duan, J. Feuerhelm, C. Grittini, S.K. Grzechnik, J. Hale, E. Hampton, J. Haugen, L. Jaroszewski, K.K. Jin, H. Johnson, H.E. Klock, M.W. Knuth, E. Koesema, A. Kreusch, P. Kuhn, I. Levin, D. McMullan, M.D. Miller, A.T. Morse, K. Moy, E. Nigoghossian, L. Okach, S. Oommachen, R. Page, J. Paulsen, K. Quijano, R. Reyes, C.L. Rife, E. Sims, G. Spragg, V. Sridhar, R.C. Stevens, H. van den Bedem, J. Velasquez, A. White, G. Wolf, Q. Xu, K.O. Hodgson, J. Wooley, A.M. Deacon, A. Godzik, S.A. Lesley, I.A. Wilson, Comparative structural analysis of a novel glutathione S-transferase (ATU5508) from *Agrobacterium tumefaciens* at 2.0 Å resolution, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 65 (2006) 527–537, <https://doi.org/10.1002/prot.21130>.
- [12] G. Di Pietro, L.A.V. Magno, F. Rios-Santos, Glutathione S-transferases: an overview in cancer research, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6 (2010) 153–170, <https://doi.org/10.1517/17425250903427980>.
- [13] E. Laborde, Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death, *Cell Death Differ.* 17 (2010) 1373–1380, <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.80>.
- [14] S.L. Holley, A.A. Fryer, J.W. Haycock, S.E.W. Grubb, R.C. Strange, P.R. Hoban, Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2268–2273, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm135>.
- [15] U. Pastart, M. De Boever, E. Claeys, S. De Smet, Effect of muscle and post-mortem rate of pH and temperature fall on antioxidant enzyme activities in beef, *Meat Sci.* 93 (2013) 681–686, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.008>.
- [16] S.B. Rønning, P.V. Andersen, M.E. Pedersen, K. Hollung, Primary bovine skeletal muscle cells enters apoptosis rapidly via the intrinsic pathway when available oxygen is removed, *PLoS One* 12 (2017) e0182928, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182928>.
- [17] C.M. Kemp, T. Parr, Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation, *Meat Sci.* 92 (2012) 252–259, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.013>.
- [18] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061> (Accessed 16 January 2018).
- [19] M. Stephens, P. Scheet, Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 449–462, <http://stephenslab.uchicago.edu/assets/papers/Stephens2005.pdf> (accessed 22 January 2018).
- [20] P.C. Ng, S. Henikoff, Predicting deleterious amino acid substitutions, *Genome Res.* 11 (2001) 863–874, <https://doi.org/10.1101/gr.176601>.
- [21] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nat. Methods* 7 (2010) 248–249, <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>.
- [22] V. Pejaver, J. Urresti, J. Lugo-Martinez, K.A. Pagel, G.N. Lin, H.-J. Nam, M. Mort, D.N. Cooper, J. Sebat, L.M. Iakoucheva, S.D. Mooney, P. Radivojac, MutPred2: inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants, *BioRxiv* (2017) 1–28, <https://doi.org/10.1101/134981>.
- [23] E. Capriotti, P. Fariselli, R. Casadio, I-Mutant2.0: predicting stability changes upon